

Az autofág gének szerepe a stressz-indukált sejtpusztulásban *C. elegans*ban

Doktori értekezés

Borsos Éva



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Biológia Doktori Iskola

Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program

A Doktori Iskola vezetője: dr. Erdei Anna akadémikus

Programvezető: dr. Orosz László akadémikus

Témavezető: dr. Vellai Tibor docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar

Genetikai Tanszék

Budapest

2010

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. BEVEZETÉS	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1. Az apoptózis	11
2.1.1. Apoptózis <i>C. elegans</i> ban	12
2.1.2. Apoptózis emlőszövetben	14
2.1.3. Az apoptózis szabályozása	16
2.2. Autofágia	17
2.2.1. Az autofágia főbb típusai	18
2.2.2. Az autofágia mechanizmusa	20
2.2.2.1. Az autofágia indukciója	22
2.2.2.2. Vezikula nukleáció	22
2.2.2.3. Vezikula elongáció	24
2.2.2.4. Autofagoszóma és lizoszóma fúziója	24
2.2.3. Az autofágia szabályozása	26
2.2.4. Az autofágia szerepe a fejlődésben és betegségekben	27
2.2.5. Az autofágia és apoptózis kapcsolata	28
2.3. A <i>Caenorhabditis elegans</i> , mint genetikai modell rendszer	30
2.4. A dUTPáz	32
2.4.1. A dUTPáz szerepe a rákterápiában	34
2.4.2. A <i>C. elegans</i> dUTPáz	35
3. CÉLKITŰZÉSEK	37
4. ANYAGOK és MÓDSZEREK	39
4.1. Törzsek fenntartása	39
4.2. Használt törzsek	39
4.3. <i>C. elegans</i> embriók preparálása	41
4.4. RNS interferencia (RNSi)	41
4.5. RNSi konstrukciók készítése	42
4.5.1. Totál RNS izolálás	42
4.5.2. RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)	43
4.5.3. A PCR termék izolálása agarból (Quiagen)	43
4.5.4. A DNS fragment ligálása RNSi vektorba	44
4.5.5. A kész konstrukció transzformálása baktérium sejtekbe	44
4.5.6. Plazmid DNS izolálás Wizard Plus SV Minipreps segítségével	44
4.5.7. Restrikciós emésztés és tesztelés	45
4.6. Fénymikroszkópos vizsgálatok	45
4.7. Embrió életképesség meghatározás	45
4.8. Vulva számlálás	46
4.9. Élethossz mérés	46
4.10. Elektronmikroszkópia	46
4.11. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) festés	47
4.12. Antitestfestés egész állaton	48
4.13. Antitestfestés embriókra	49

4.14. lacZ festés egész állatra és embrióra	51
4.15. EMSA (electrophoretic mobility shift assay)	51
5. EREDMÉNYEK	52
5.1. A <i>C. elegans</i> dUTPáz kódoló <i>dut-1</i> gén jellemzése	52
5.1.1. A <i>C. elegans</i> dUTPáz fehérje	52
5.1.2. A <i>C. elegans</i> dUTPáz expressziós vizsgálata	53
5.1.2.1. A dUTPáz egyedfejlődési mintázata <i>C. elegans</i> ban	54
5.1.2.2. A <i>C. elegans</i> dUTPáz fehérje lokalizációja	56
5.1.3. A dUTPáz inaktiválása embrionális életképtelenséget okoz <i>C. elegans</i> -ban	57
5.1.4. Az apoptózis és autofág gének funkcióvesztéses mutációi nem, az autofágia gén <i>lgg-1/Atg8</i> funkcionális kópiája részlegesen szuppresszálja a <i>dut-1</i> gén inaktiválása által okozott embrionális és lárvális életképtelenséget	62
5.1.5. A <i>dut-1</i> inaktiválása fokozza az autofágia gének embrionális expresszióját	65
5.1.6. A dUTPáz inaktiválása befolyásolja a <i>C. elegans</i> öregedési folyamatát	67
5.1.7. Sejthalált indukáló farmakológiai és genetikai inzultusok hatására az autofágia gének expressziója megnövekedett embrionális sejtekben	68
5.1.8. Konzervált transzkripció faktor kötőhelyek meghatározása autofág gének promóterében	71
5.1.9. Az ATF-2 autofágia génexpressziót szabályozó szerepének <i>in vivo</i> bizonyítása	76
5.2. A dUTPáz kapcsolata a synMuv útvonalakkal	77
5.3. Az autofág gének szerepe az élethossz szabályozásában	79
6. KÖVETKEZTETÉSEK	83
7.1. A <i>dut-1</i> gén inaktiválása embrionális letalitást eredményez	83
7.2. dUTPáz deficiens fejlődésben megrekedt embriókban az autofág gének expressziója hiperaktiválódik	84
7.3. Embrió letalitást okozó stresszhatások az autofág génkaskád expresszióját hiperaktiválják	84
7.4. Az apoptózis és az autofágia gyakran együtt aktiválódik bizonyos fiziológiai és patológiai kondíciókban	86
7.5. A <i>C. elegans</i> ban csak egyféle dUTPáz izoforma van?	87
7.6. A <i>C. elegans</i> dUTPáz redukált expressziója	87
7.7. Az autofág és apoptotikus génkaskádok közös transzkripcionális szabályozása	88
7.7. Az autofág és apoptotikus génkaskádok közös transzkripcionális szabályozása	89
7.8. Az autofág gének szerepe az élethossz szabályozásában	90
X. ÖSSZEFOGLALÁS	92
X. SUMMARY	93
7. FELHASZNÁLT IRODALOM	95
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	107

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABL	(<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>) Abelson murine leukémia virális homológ
AMP	(<i>Adenosine monophosphate</i>) Adenozin monofoszfát
AMPK	(<i>AMP-activated protein kinase</i>) AMP-függő kináz
APAF	(<i>Apoptotic peptidase activating factor</i>) Apoptotikus peptidáz aktiváló faktor
APE	(<i>Apoptotic enhancer</i>) Apoptózis erősítő
ATG	(<i>Autophagy related gene</i>) Autofág gén
ATM	(<i>Ataxia Telangiectasia mutant</i>) Ataxia Telangiectasia mutált
ATP	(<i>Adenosine triphosphate</i>) Adenozin trifoszfát
BAD	(<i>Bcl-2-associated death promoter</i>) Bcl-2 asszociált halál promóter
BAK	(<i>Bcl-2 homologous antagonist</i>) Bcl-2 homológ antagonista
BAX	(<i>Bcl-2-associated X protein</i>) Bcl-2 asszociált X fehérje
BCL	(<i>B cell lymphoma</i>) B sejt limfóma
BH	(<i>Bcl-2 homologue domain</i>) Bcl-2 homológ domén
BID	(<i>BH3 interacting domain death agonist</i>) BH3-mal kölcsönható domén
bZip	(<i>Leucin zipper protein</i>) Leucin zippzár fehérje
CED	(<i>Cell death abnormal</i>) Sejthalál defektív
CEH	(<i>C. elegans HOX genes</i>) <i>C. elegans</i> HOX gének
CES	(<i>Cell death specification gene</i>) Sejthalál specifikáló gén
CHK	(<i>Checkpoint controll kinase</i>) Ellenőrző pont kináz
CLK	(<i>Clock abnormal protein</i>) Clock (óra) abnormális fehérje
CMA	(<i>Chaperone-mediated autophagy</i>) Chaperon-közvetített autofágia
Cvt	(<i>Cytoplasm-to-vacuole targeting pathway</i>) Citoplazma-vakuólum szállítási útvonal
DAF	(<i>Dauer formation mutant</i>) Dauer képződési mutáns
DAPI	4,6'-diamidino-2-phenylindole
DAPK	(<i>Death-associated protein kinase 1</i>) Halál asszociált protein kináz 1

DCD	(<i>Deoxycitidilate deaminase</i>) Deoxicitidilát deamináz
dCMP	(<i>Deoxycytidyl monophosphate</i>) Deoxycytidyl monofoszfát
dCTP	(<i>Deoxycytidyl triphosphate</i>) Deoxycytidyl trifoszfát
dCMP	(<i>Deoxycytidyl monophosphate</i>) Deoxycytidyl monofoszfát
DEPC	(<i>Diethyl-pyrocarbonate</i>) Dietil-pirokarbonát
DHF	(<i>Dihydrofolate</i>) Dihidrofolát
DHFR	(<i>Dihydrofolate reductase</i>) Dihidrofolát reduktáz
DIC	(<i>Differential interference contrast microscopy</i>) Differenciális interferencia kontraszt mikroszkópia
DLC	(<i>Dynein light chain</i>) Dinein könnyű lánc
DNS	Dezoxiribonukleinsav
Dntp	(<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>) Deoxyribonukleotid trifoszfát
DPL	(<i>Protein Doppel</i>) Doppel fehérje
DRAM	(<i>Damage-regulated autophagy modulator</i>) Károsodás által irányított autofágia modulátor
DRH	(<i>Dicer recommended helicase</i>) Dicerhez kapcsolódó helikáz
dsRNS	(<i>Double-stranded RNA</i>) Duplaszálú RNS
dTDP	(<i>Thymidine 5'-diphosphate</i>) Timidin 5'-difoszfát
dTMP	(<i>Thymidine 5'-monophosphate</i>) Timidin 5'-monofoszfát
DTT	Dithyothreitol
dTTP	(<i>Thymidine 5'-triphosphate</i>) Timidin 5'-trifoszfát
dUDP	(<i>Deoxyuridine diphosphate</i>) Deoxyuridin difoszfát
dUMP	(<i>Deoxyuridine monophosphate</i>) Deoxyuridin monofoszfát
dUTP	(<i>Deoxyuridine triphosphate</i>) Deoxyuridin trifoszfát
DUT-M	dUTPáz mitokondriális izoformája
DUT-N	dUTPáz sejtmagi (nukleáris) izoformája
dUTP	(<i>Deoxyuridine triphosphate</i>) Deoxyuridin trifoszfát
dUTPáz	(<i>Deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase</i>) Deoxyuridin trifoszfát nukleotidohidroláz
E1	Ubikvitint aktiváló enzim
E2	Ubikvitint konjugáló enzim
EGL	(<i>Egg laying defective</i>) Tojás rakási mutáns
EMSA	(<i>Gel mobility shift assay</i>) Gélretardációs vizsgálat

ER	(<i>Endoplasmatic reticulum</i>) Endoplazmás retikulum
EtOH	Etanol
FADD	(<i>Fas-associated death domain</i>) Fas asszociált halál domén
FOX	<i>Forkhead box</i>
FU	5'-Fluoro-uracil (5-FU)
FudR	5'-Fluoro-2'-deoxyuridin
GDP	(<i>Guanidin diphosphate</i>) Guanidin difoszfát
GFP	(<i>Green Fluorescent Protein</i>) Zöld fluoreszcens fehérje
GTP	(<i>Guanidin triphosphate</i>) Guanidin trifoszfát
HOX	(<i>Homeobox genes</i>) Homeotikus gének
HuBaR	dUTPázok egyik családja
IGF	(<i>Insulin-like growth factor</i>) Inzulín-szerű növekedési faktor
IL-3	Interleukin-3
IPTG	(<i>Isopropyl-beta-D-thiogalactoside</i>) Izopropil-béta-D-tiogalaktozid
JNK	(<i>C-Jun N-terminal kinase</i>) C-Jun N-terminális kináz
kb	(<i>Kilobase</i>) kilobázis, a gének hosszúságát kifejező mértékegység
LAMP	(<i>Lysosome-associated membrane protein-2a</i>) Lizoszóma asszociált membrán fehérje-2a
LB	(<i>Luria-Bertani Medium</i>) Luria-Bertani tápoldat
LET	(<i>Lethal phenotype</i>) Letális fenotípus
MAPK	(<i>Mitogen-activated protein kinase</i>) Mitogén aktivált protein kináz
MHC	(<i>Major histocompatibility complex</i>) Fő hisztokompatibilitási komplex
MQ	(<i>Milli-Q-water</i>) nagy tisztaságú, steril víz
MT	(<i>Metotrexate</i>) Metotrexát
MTHF	(<i>Methylen tetrahydrofolate</i>) Metilén tetrahidrofolát
NDP	(<i>Nucleoside diphosphate kinase</i>) Nukleozid difoszfát kináz
NGM	(<i>Nematode growth medium</i>) Nematoda tenyésztő médium
NURD	(<i>Nucleosome remodeling and histone deacetylation complex</i>) Nukleoszóma átalakító és hiszton deacetilációs komplex
ORF	(<i>Open reading frame</i>) Nyílt leolvasási keret

PAS	(<i>Pre-autophagosomal structure</i>) Pre-autofagoszomális struktúra
PAZ- PIWI	PAZ: Piwi/Argonaute/Zwille fehérjék által alkotott domén PIWI: P-elem által indukált <i>wimpy</i> tesztis (<i>Drosophila</i>)
PCD	(<i>Programmed cell death</i>) Programozott sejthalál
PCR	(<i>Polimerase chain reaction</i>) Polimeráz láncreakció
PE	(<i>Phosphatidyl ethanolamine</i>) Foszfatidil etanolamin
PHA	(<i>Defective pharynx development</i>) Defektív garat fejlődés
PI3K	(<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>) Foszfatidilinozitol-3-kináz
PIP ₃	(<i>Phosphatidylinositol-3-phosphate</i>) Foszfatidilinozitol-3-foszfát
PKA	(<i>Protein kinase A</i>) Fehérje kináz A
PUMA	(<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>) p53 által szabályozott apoptózis modulátor
RDP	(<i>Rapidly degraded polypeptides</i>) Gyorsan degradálódó fehérjék
PHG	(<i>Pharynx associated GAS related</i>) Garat asszociált GAS kapcsolt fehérje
RNR	(<i>Ribonucleoside diphosphate reductase</i>) Ribonukleozid difoszfát redukáz
RNS	Ribonukleinsav
Ser	Szerin
SHMT	(<i>Serine hydroxymethyl transferase</i>) Szerin hidroximetil transzferáz
SNARE	(<i>Soluble NSF and SNAP receptor protein</i>) Szolubilis NSF és SNAP receptor fehérje
SWLP	(<i>Single worm lyses buffer</i>) Egy fereg lízis puffer
synMuv	(<i>synthetic Multivulva</i>) Szintetikus multivulva
T	Timin
TBE	(<i>Tris-borate-EDTA buffer</i>) Tris-borát-EDTA puffer
TDT	(<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i>) Terminális deoxinukleotidil transzferáz
TE	(<i>Tris-EDTA buffer</i>) Tris-EDTA puffer
TGF- β	(<i>Transforming growth factor-beta</i>) Transzformáló növekedési faktor
TK	(<i>Thymidin kinase</i>) Timidin kináz
TNF	(<i>Tumor necrosis factor</i>) Tumor nekrozis faktor

TNFR	(<i>Tumor necrosis factor receptor</i>) Tumor nekrozis faktor receptor
TOR	(<i>Kinase target of rapamycin</i>) Rapamycin által gátolt kináz
TRAIL	(<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>) Tumor nekrozis faktor családba tartozó apoptózist indukáló ligandum
TS	(<i>Thymidine synthase</i>) Timidin szintáz
TSN	(<i>Tudor staphylococcal nuclease</i>) Tudor Staphylococcal nukleáz
TTP	(<i>Thymidine triphosphate</i>) Timidin trifoszfát
TUNEL	(<i>Terminal deoxynucleotidil transferase mediated nick end labeling</i>) Terminális deoxinukleotidil transzferáz közvetített hasítási végjelölés
UDG	(<i>Uracil DNA glycosylase</i>) Uracil DNS glikoziláz
UNC	(<i>Uncoordinated</i>) Béna – paralizált – mozgású fenotípus

1. BEVEZETÉS

Az eukarióta sejtek programozott – egyedfejlődési program által szabályozott – halála (röviden: programozott sejthalál) éppen olyan fontos sejttani folyamat, mint a sejtnövekedés, sejtosztódás vagy a sejtmozgás. Lehetővé teszi, hogy az élőlények szigorú határok között tarthassák sejtjeik számát, szöveteik méretét, valamint megszabaduljanak a potenciálisan károsító (pl. tumoros) sejtektől. A programozott sejthalál hibája emberben számos egyedfejlődési rendellenességhez és degeneratív elváltozáshoz (pl. rák, neurodegeneratív betegségek, II típusú diabétesz) vezethet. Noha a legújabb irodalom számos programozott sejthalál formát különböztet meg, a három mennyiségileg legjelentősebb típusa az apoptózis (I típusú programozott sejthalál), az autofágia (II típusú programozott sejthalál) és a nekrozis.

Az apoptózis elsődleges szerepe az egyedfejlődés során feleslegessé vált vagy károsodott sejtek eltávolítása. A folyamatot indukálható, tehát nem programozott módon is kiválthatják vírusfertőzések, környezeti stressz, DNS-t károsító ionizáló sugárzás, kemikáliák és toxinok. Az apoptotikus sejt maradványait végső soron fagocitáló (heterofág) sejtek távolítják el.

Az autofágia (jelentése: *auto*: ön, *phagein*: emésztés – sejtés önmésztés) az eukarióta sejtek szabályozott önmésztő (lebontó – katabolikus) folyamata, amely során a citoplazma egy részlete lizoszómákba (membránnal határolt μm -es méretű vezikulumok) jut, ahol lizoszómális hidrolázok (pl. proteázok, nukleázok, lipázok) bontják le a bekebelezett anyagokat alkotóelemeikre. Az így keletkezett sejtalkotók felhasználódhatnak a sejt anyagainak felépítésében (molekuláris *turnover*) vagy energiaként hasznosulhatnak a sejt számára éhezési körülmények között. Az autofágia tehát elsődlegesen a sejt túlélését biztosító (*pro-survival*) mechanizmus. Bizonyos körülmények között azonban az autofág folyamat a sejt pusztulásához is vezethet. Ma sem tisztázott teljes mértékben, hogy az autofág sejthalál az apoptózis folyamatán keresztül (azt serkentve) vagy attól függetlenül megy végbe. Az autofágia szerepet játszik a sejt anyagainak megújításában, a károsodott intracelluláris komponensek eltávolításában, és ezen keresztül az öregedési folyamat szabályozásában, differenciációs folyamatokban, az éhezési stresszhez történő sejtadaptációban, és az intracelluláris patogének eltávolításában.

Az apoptotikus és autofág sejthalál folyamatok morfológiailag eltérőek. Napjainkban azonban egyre több adat bizonyítja azt, hogy szabályozásuk szorosan kapcsolt. Emberben számos patológiai elváltozásban egyszerre figyelhető meg a két folyamat abnormális működése. Kitűnő példa erre számos tumoros elváltozás. Egyedfejlődési és orvosbiológiai jelentősége ellenére azonban ma sem ismert, hogy a sejt stresszválaszban és egyedfejlődési lépésekben hogyan jelennek meg és mennyire keverednek az apoptotikus és autofág elemek.

A fonalféreg *Caenorhabditis elegans* kitűnő genetikai modell rendszer a programozott sejthalál folyamatok tanulmányozásához. A *C. elegans* szomatikus sejtleszármazása nagymértékben invariáns és meghatározott. Az állat teste fénymikroszkóp alatt áttetsző (transzparens), így a sejtek sorsa, túlélése vagy pusztulása az egyedfejlődés során egyedileg nyomon követhető. A hermafrodita állat egyedfejlődése során keletkezett 1090 szomatikus sejtből 131 pusztul el programozott módon. E sejtpusztulási folyamatok jelentős része az embrionális fejlődés során megy végbe.

Doktori munkám során autofág gének szerepét vizsgáltam a *C. elegans* korai egyedfejlődési folyamataiban, valamint sejthalálhoz vezető stressz-faktorokra adott válaszreakciókban. Megállapítottuk, hogy a sejtpusztulást előidéző stresszek hatására az autofág gének transzkripciós aktivitása jelentős mértékben megnő. Ezen stressz-faktorok hatására elpusztuló embriókban jelentős autofág aktivitást mutattunk ki elektron- és fénymikroszkópos módszerek segítségével (itt fontos megjegyezni, hogy a normálisan fejlődő vad típusú embriókban nem mutathatók ki autofág struktúrák elektronmikroszkópos módszerekkel). Sikertült meghatározni egy olyan konzervált transzkripciós faktort, amely mind az apoptotikus, mind az autofág útvonal szabályozásában alapvető szerepet játszik. Végül igazoltuk, hogy az autofágia-apoptózis deficiens kettős mutáns fonalférgek elpusztulnak az egyedfejlődés korai szakaszában, és ezek az elpusztult embriók súlyos morfofenetikai rendellenességeket mutatnak. A két folyamat tehát redundánsan szabályozza az embriógenézist *C. elegans*-ban. Ezek az eredmények elvezethetnek a korai egyedfejlődési események pontosabb megértéséhez fonalférgekben, valamint számos sejtpusztulással együtt járó patológiai elváltozás (pl. neurodegeneráció, izomsorvadás) molekuláris hátterének pontosabb megismeréséhez emlős rendszerekben.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Bizonyos sejtek pusztulása esszenciális a normális egyedfejlődési folyamatokhoz és a szöveti homeosztázis fenntartásához. A sejtpusztulás hiánya vagy túlzott működése morfogenetikai defektusokhoz és degeneratív elváltozásokhoz vezethet. Az eukarióta sejtek pusztulása számos – egymástól morfológiailag jól megkülönböztethető – módon mehet végbe; ezek közé tartozik az apoptózis, az autofágia, a nekrozis és a kornifikáció (Kroemer és Levine, 2008). Egyedfejlődési szerepüket tekintve ezek közül a legjelentősebbek az apoptózis és az autofágia.

2.1. Az apoptózis

Az apoptózis (vagy másképpen I. típusú programozott sejthalál) egy olyan degradációs sejtpusztulási folyamat, amely szigorú genetikai kontroll (szabályozás) alatt áll. Ez azt jelenti, hogy az apoptotikus sejthalál csak bizonyos gének (és termékeik) aktív működése mellett megy végbe. A központi apoptotikus sejthalál útvonal evolúciónan nagymértékben konzervált. Funkciója a szervezetben található károsodott vagy feleslegessé vált sejteket eltávolítása az egyedfejlődés folyamán vagy patológias körülmények között. Elsőként Currie és munkatársai említik 1972-ben megjelent cikkükben (Kerr és mtsi., 1972), amelyben egy egyedfejlődésileg szabályozott, többféle szövet- és sejtípusban is megfigyelhető sejthalál típust írnak le.

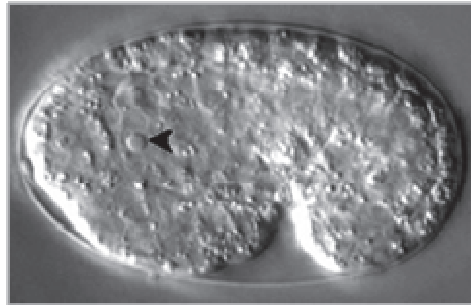
Az apoptotikusan pusztuló sejt morfológiájára jellemző, hogy a citoplazma és a membránok összezsugorodnak, a DNS letekeredik, a sejtanyag fragmentálódik, az endoplazmatikus retikulumról riboszómák válnak le, lizoszómális proteázok kerülnek a citoszólba, illetve fehérjebontó tulajdonságú kaszpázok (enzimek) aktiválódnak. A folyamat eredményeként fénymikroszkópban fénytörő képességű (ún. refraktilis) apoptotikus testek jönnek létre. Az apoptotikus testeket a szomszédos sejtek távolítják el – a folyamatot heterofágiának nevezik (Ellis és Horvitz, 1991). Az apoptózis során a sejtalkotók és lizoszómális enzimek nem kerülnek ki az extracelluláris térbe, így nem lépnek fel gyulladásos folyamatok, nincs neutrofil granulocita, illetve limfocita infiltráció az elpusztuló sejt körül.

Az apoptózis egyik általános jellemzője, hogy különböző szignálok (pl. DNS károsodás, közvetlen fizikai behatás vagy genetikai program) hatására megy végbe. Emlősökben az apoptózis két útvonalon is megvalósulhat. Az egyik útvonal az ún. sejthalál receptorok közvetítésével, a másik útvonal pedig mitokondriális rendszer közvetítésével megy végbe (Bloss és mtsi., 2003). Közös jellemzőjük a pro- és anti-apoptikus géntermékek közötti egyensúly eltolódása a pusztulás irányába. A folyamatban központi szerepet bizonyos

ciszteín-aszpartil proteázok (kaspázok) játsszák. Ezek az enzimek bontják le a sejt bizonyos fehérjeit. Általában egy előre meglévő inaktív formában vannak jelen, majd az apoptotikus útvonal aktivációjára válnak enzimatikusan aktívvá (Hengartner, 2000).

2.1.1. Apoptózis *C. elegans*ban

*C. elegans*ban a programozott sejthalál a normális egyedfejlődés része (**1. ábra**). A hermafrodita fonalféreg egyedfejlődése során összesen 1090 szomatikus sejt képződik, ezek közül 131 sejt pusztul el programozott módon (Sulston és Horvitz, 1977). Mivel ezek az elpusztuló sejtek fénymikroszkóp segítségével egyedileg azonosíthatók, a *C. elegans* kitűnő kísérletes objektumnak bizonyult az apoptózis szabályozásának felderítéséhez (Schultz és Harrington, 2003). Szisztematikus mutagenézis vizsgálatok segítségével Horvitz és munkatársai számos olyan gént határoztak meg ebben az organizmusban, amelyek szükségesek az apoptózis folyamatához. Ezeket a faktorokat sejthalál vagy *ced* (*cell death defective*) géneknek nevezték el. A *ced* géneket két csoportra lehet osztani: apoptózist serkentő (pro-apoptotikus) és apoptózist gátló (anti-apoptotikus) génekre (Horvitz, 2003)



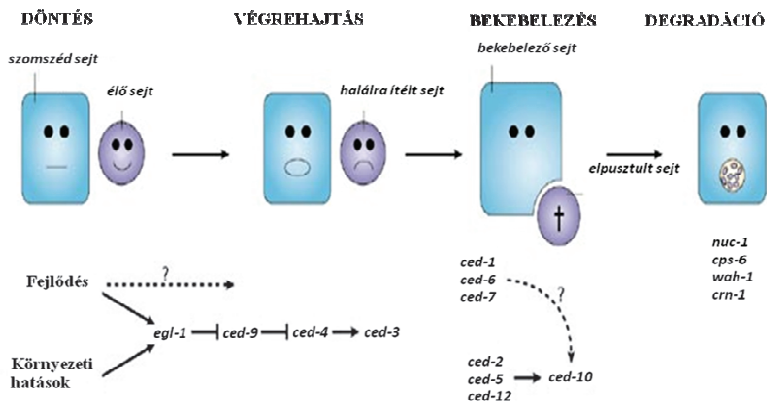
1. Ábra. Apoptózis a *C. elegans* embriogenezise során. Egy korai (*comma*-állapotú) vad típusú *C. elegans* embrió. Az apoptotikus sejttestet (fénytörő kerek sejt) fekete nyíl jelöli. DIC (*differential interference contrast*) objektívvel készült fénymikroszkópos kép.

Közel tíz éves kutatási program eredményeként Horvitzék egy központi apoptotikus genetikai útvonalat határoztak meg, amelyben a gének egy lineáris tengely mentén helyezkednek el, és egymás aktivitását szabályozzák (gátolják vagy aktiválják). Az útvonal tagjai közé tartoznak az *egl-1* (*egg-laying defective-1*), *ced-9* (*cell death defective-9*), *ced-3* és *ced-4* gének (Yuan és mtsi., 1993, Xue és mtsi., 1996). Az *egl-1*, *ced-4* és *ced-3* gének funkciója teszi lehetővé az apoptotikus sejthalál végbemenetelét; ezek a pro-apoptotikus

gének, amelyek funkcióvesztéses mutáció felfüggesztik az apoptózis folyamatát (Schultz és Harrington, 2003). Velük ellentétesen működik a *ced-9*; ez a gén gátolja az apoptózis végbemenetelét, tehát anti-apoptotikus faktorként funkcionál (Hengartner és mtsi., 1992). A *ced-9* egy Bcl-2 (*B cell lymphoma-2*)-szerű mitokondriális membrán fehérjét kódol. *ced-9* funkcióvesztéses mutációk tömeges apoptotikus sejthalált – és ennek eredményeként életképtelenséget – okoznak korai embriókban. *ced-9* funkciónyeréses mutációk viszont meggátolják a normális sejtpusztulási folyamatokat: a kifejllett mutáns állatok 131 szomatikus sejttel többet tartalmaznak a vad típusnál. A CED-4 fehérje egy proteáz aktiváló faktor, a humán Apaf-1 fehérje nematoda ortológia (Kumar és mtsi., 2004). A CED-4 aktivitása szükséges végső soron a CED-3 kaszpáz (proteáz) aktiválásához, amely fehérjék bontásán keresztül okozza a sejt pusztulását.

A *C. elegans* apoptotikus génkaszkád működésének logikája tehát a *ced-9* génre épül: a CED-9 – mint az élet és halál közötti választás fő faktora – meggátolja a túlélő sejtekben a CED-3 (pro)kaspáz aktiválódását. A *ced-9* aktivitását az EGL-1 szabályozza, amely egy csak BH3 (*Bcl-2* homológ) domént (*BH3-only*) tartalmazó fehérje (Hofmann és mtsi., 2002). Amikor az EGL-1 kötődik a CED-9-hez, az elválik a CED-4-től, és lehetővé teszi annak CED-3 aktiváló funkcióját. A mai sejthalál kutatások egyik központi kérdése továbbra is az, mi aktiválja az *egl-1* transzkripcióját a pusztulásra ítélt sejtekben (2. ábra).

Bizonyos sejtekben a *C. elegans* apoptotikus útvonal *upstream* tagja a *ces-2* gén, amely egy bZip-szerű transzkripciósfaktort kódol (Metzstein és mtsi., 1996). A CES-2 közvetlenül gátolja CES-1 cink-ujj transzkripciósfaktort, amely aztán az *egl-1*-et represszálja transzkripcionálisan.



2. Ábra. Az apoptózis fázisai és a szabályozásban résztvevő gének *C. elegans*-ban. Stimulus (pl. egyedfejlődési jel, környezeti hatás) hatására aktiválódik a programozott sejthalál útvonala. Első lépésben a halálra ítélt sejt jelölődik ki. Ennek során az *egl-1* gén transzkripcionálisan aktiválódik. Az EGL-1 pro-apoptotikus fehérje aztán gátolja a CED-9 anti-apoptotikus fehérjét, amely így nem tudja represszálni CED-4 Apaf-1-szerű pro-apoptotikus fehérjét. Az aktív CED-4 aktiválja a CED-3 kaspázt, amely végül lebontja a sejt fehérjeinek egy részét. Az így elpusztuló sejtet (apoptotikus sejttest) végül a szomszédos sejtek fagocitálják. A sejttest eltávolításához számos további *ced* gén terméke szükséges: *ced-1*, *ced-6*, *ced-7*, *ced-2*, *ced-5*, *ced-12* és *ced-10*. A folyamat befejezéseként a bekebelezett sejttest degradálódik a *nuc-1*, *cps-6*, *wah-1* és *crn-1* gének által kódolt fehérjék által.

2.1.2. Apoptózis emlősökben

Az apoptózis során megfigyelhető legtöbb sejttani változás a folyamatban résztvevő cisztein proteázok aktivitásának eredménye. Ezek a fehérjék egy nagy protein családba (kaspázok) tartoznak. A kaspázok aktív centrumában egy cisztein található, amely a fehérjéket az aszparaginsav oldalláncok után képes elhasítani. Egy inaktív (zimogén) kaspáz fehérje három doménből áll: egy pro-doménből, valamint a p20-as és p10-es doménből. A p20-as és p10-es pro-domének között egy effektor kaspáz végez hasítást, amelynek eredményeként a zimogén aktiválódik. Ilyenkor az érett enzimben két aktív hellyel rendelkező heterotetramer forma alakul ki (Borner és Money, 1999).

A kaspázok több csoportba osztályozhatók. Egyik csoportjuk az apoptózis folyamatában vesz részt (kaspáz-2, -3, -7), másik csoportjuk pedig az őket aktiváló kaspázok csoportjába (kaspáz-6, -8, -9, -10). Az apoptózishoz többféle kaspáz aktivációs útvonala tartozik: ilyenek a mitokondriális és a sejthalál-receptor közvetített útvonalak.

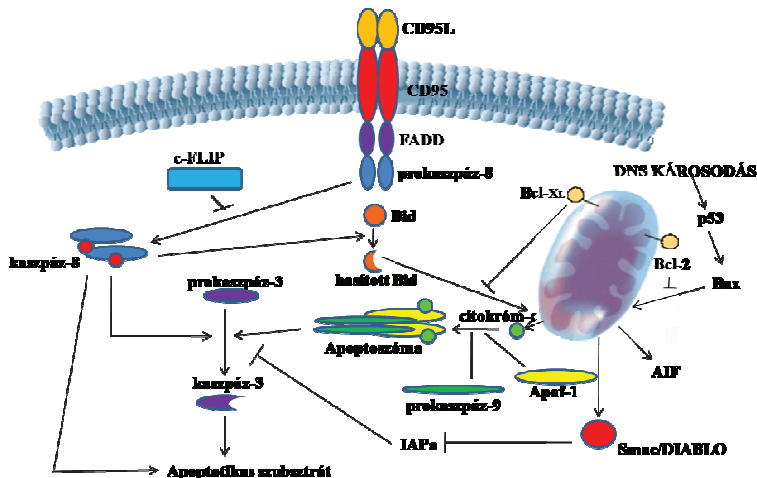
A mitokondriális apoptotikus útvonalat gyakran pro-apoptikus fehérjék indítják el, melyek a csak BH3 domént tartalmazó fehérje család tagjai (Hengartner és Horvitz, 1994). Ebbe a családba olyan fehérjék tartoznak, amelyek receptor-kötöten helyezkednek el vagy a citoszolban oldva találhatók. Ezek a citoplazmatikus fehérjék inaktívak és apoptikus jel hatására kerülnek a mitokondriumba. Hatásukra a mitokondrium membránján pórusok keletkeznek, melyeken keresztül citokróm-c molekulák áramlanak ki az organellumból a citoplazmába. A citokróm-c komplexet képez apoptózis proteáz-aktiváló faktor 1-gyel (Apaf-1), amelynek szubsztrátja a pro-kaspáz-9. Az aktív kaspáz-9 végül aktiválja az útvonal terminális elemét, a kaspáz-3-t (3. ábra).

	SZABÁLYOZÓ		ADAPTOR		VÉGREGHAJTÓ
<i>C. elegans</i>	<i>ced-9</i>	—	<i>ced-4</i>	→	<i>ced-3</i> → <i>halál</i>
<i>Emlősök</i>	<i>Bcl-2</i>	—	<i>Apaf-1</i>	→	<i>kaspáz-9</i> → <i>kaspáz-3</i> → <i>sejthalál</i>

3. Ábra. Az apoptotikus genetikai útvonal konzervált nematodák és emlősök között. *C. elegans*ban a *ced-9* gátolja a *ced-4*-t. Ebben az állapotban a *ced-3* inaktív. Amikor a CED-4 aktiválódik, beindul a sejtpusztuláshoz vezető folyamat. Emlősökben a *Bcl-2* gátolja az *Apaf-1*-et, míg az *Apaf-1* aktivitása szükséges a degradációt szabályozó *kaspáz-9* és *kaspáz-3* gének aktiválódásához.

A sejthalál-receptor útvonalban résztvevő főbb kaspázok a kaspáz-8 és a kaspáz-3. Az útvonal egy sejthalál-receptor családba tartozó fehérjével kezdődik: ez a Fas/CD95 vagy a tumornekrózis-faktor receptor I (TNFR). A Fas receptorhoz kerülő FasL ligandum kapcsolódása után a Fas-kapcsolt sejthalál domén (FADD) aktiválja a prokaspáz-8 fehérjét. Az aktiválódott kaspáz-8 egy effektor kaspáz, mely a kaspáz-3 aktiválását végzi (Hengartner, 2000) (4. ábra).

Az apoptózisban szereplő fehérje-fehérje interakciók szabályozásában főleg a Bcl-2 család tagjai vesznek részt. A család tagjai szerkezetük és funkciójuk alapján három csoportra oszthatók (Saeki és mtsi., 2000). Az első csoport tagjai anti-apoptotikus aktivitással rendelkeznek (pl. Bcl-2, Bcl-x_L), és négy rövid BH domént tartalmaznak. A második csoport tagjai apoptózist aktiválnak és csak három BH doménnel rendelkeznek (pl. Bax, Bak). A harmadik csoport tagjai csak a BH3 domént tartalmazzák.



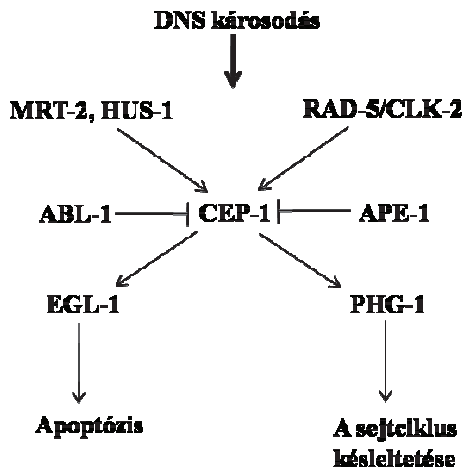
4. Ábra. Az emlős apoptotikus útvonalak. Az ábra baloldali részén látható a sejthalál-receptor útvonal. Ebben a kaszpáz-8 és kaszpáz-3 fehérjéken keresztül történik az apoptózis indukálása. Az ábra jobb oldalán a mitokondriális sejthalál útvonal látható, melyben az Apaf-1 és kaszpáz-9 fehérje közreműködésével aktiválódik a kaszpáz-3. A nyílak aktiválást, a talpas nyílak gátlást jelölnek.

2.1.3. Az apoptózis szabályozása

Az apoptózis szigorú genetikai kontroll alatt áll, a normális egyedfejlődés egyik fontos eleme. A folyamatot azonban gyakran DNS-károsító stresszhatások is iniciálhatják. A szabályozás központjában a p53 nevű tumorsuppresszor fehérje áll. A p53 fontos feladatot tölt be a genetikai stabilitás fenntartásában, a rákos elváltozások, és a stressz-indukált károsodások elleni védelemben. Szekvenca specifikus transzkripciósi faktorként a p53 képes aktiválni a sejtciklus eltolódásához vagy az apoptózishoz szükséges géneket (Derry és mtsi., 2001).

A p53 aktiválódását az ATM (Ataxia Telangiectasia mutált) fehérje szabályozza (Derry és mtsi., 2001). Az ATM ugyancsak képes aktiválni a chk2 (ellenőrző pont kináz 2) fehérjét, amely foszforilálja a p53-at egy szerin oldalláncnál, és így a p53 szabaddá válik. A p53 apoptotikus fehérjét képes aktiválni, amelyek hozzájárulnak a mitokondrium membránjához, fokozzák annak permeabilitását, ez által beindul az apoptotikus sejthalál folyamata.

*C. elegans*ban a *p53*-nak egyetlen homológja van: a *cep-1* gén. Humán ortológjához hasonlóan fontos szerepet játszik a normális egyedfejlődés és a genotoxikus stressz során végbemenő sejthalál folyamatokban (Horvitz, 2003). Mennyisége és működése nagyon pontosan szabályozott, megemelkedett szintje letalitást okoz (5. ábra).



5. Ábra. A *cep-1/p53* gén szerepe az apoptózis szabályozásában. DNS károsodás hatására a *p53* beindítja az apoptotikus folyamatot, illetve késlelteti a sejtciklust a hiba kijavításáig. Működését számos faktor befolyásolja. Az *mrt-2* és *hus-1* gének termékei a sejtosztódás során észlelt DNS hibák hatására aktiválják a *cep-1*-t. A *rad-5/clk-2* terméke az S fázis ellenőrzési pontot ellenőrzi. DNS hiba esetén aktiválja a *cep-1*-t. Az *ape-1* (*apoptotic enhancer*) és *abl-1* (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog-1*) gének gátolják a *cep-1*-et. A *cep-1* sejtciklus késleltető hatását a *phg-1* (*pharynx-associated GAS related*) génen keresztül feje ki.

2.2. Autofágia

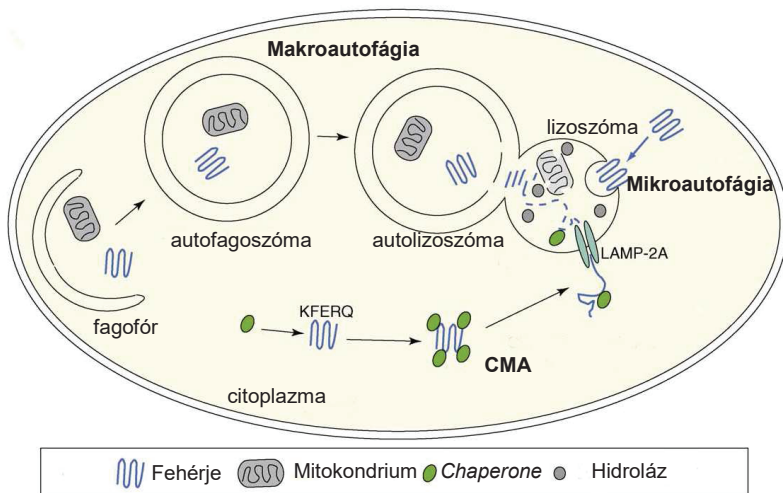
A sejtműködés homeosztázisának alapvető feltétele a makromolekulák (elsősorban fehérjék) megfelelő *turnovere*, azaz a régi komponensek lebontásának és az új komponensek szintézisének egyensúlya. A lebontó (katabolikus) folyamatok két fő ismert formája az ubiquitin-proteasóma rendszer és a lizoszóma-függő autofágia. A proteasóma rendszer (proteáz aktivitású fehérje komplex) az ubiquitinnel megjelölt fehérjék bontását végzi. Az autofágia során a citoplazma részletei szabályozott módon lizoszómákba jutnak (Zhang és mtsi., 1999). Ezek a μ m-es méretű intracelluláris vezikulumok savas hidrolázokat (peptidázok, nukleotidázok, lipázok, glikázok) tartalmaznak. A lizoszómákba került

citoplazma komponensek a savas hidrolázok által bontódnak le, majd az így keletkezett molekuláris építőkövek újra hasznosulhatnak a felépítő folyamatokban (Lum és mtsi., 2005). A lebontott komponensek energiaként is hasznosulhatnak, amely lehetővé teszi a sejt túlélését éhezési körülmények között. Az autofágia tehát elsődlegesen a sejt túlélését biztosító mechanizmusként evolválódott (Mizushima és mtsi., 2008; Kroemer és Levine, 2008).

Az autofágia élettani funkciói igen változatosak. Részt vesz a sejt felesleges, elöregedett vagy károsodott (abnormális szerkezetű és funkcióképtelen) komponenseinek lebontásában, valamint az intracelluláris patogének (vírusok és baktériumok) citoplazmából történő eltávolításában. Az autofágia alapvető szerepet játszik a sejt éhezési, hypoxiás (alacsony oxigénszint) és hipertermiás (magas hőmérséklet) stresszekre adott válaszában, a sejtnövekedés és sejtosztódás szabályozásában, a stressz-indukált és programozott sejtpusztulásban, az öregedési folyamat szabályozásában, valamint az idegsejtek és az immunrendszer működésében. Az autofág degradáció ugyancsak esszenciális a sejt anyagainak az egyedfejlődés során történő átrendezésében. A folyamat abnormális működése különböző ráktípusok, korai öregedés, neurodegeneratív betegségek, szélütés, izomsorvadás, szívelégtelenség, valamint baktériumok és vírusok által okozott fertőzések kialakulásában nyilvánul meg (Nakai és mtsi., 2007).

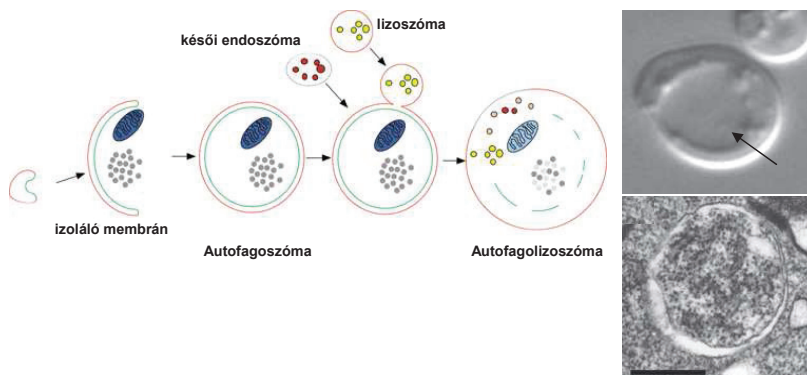
2.2.1. Az autofágia főbb típusai

A citoplazma komponenseinek lizoszómába történő transzportja alapján az autofágia 3 fő formáját különböztetik meg: mikroautofágia, *chaperone*-közvetített autofágia (CMA) és makroautofágia (6. ábra). A mikroautofágia során közvetlenül a lizoszóma membránja fűzi le a határoló citoplazma részleteket betűródéssel (invagináció). A folyamatot élesztőben és emlősökben írták le. A CMA során bizonyos pentapeptid (KFERQ) motívummal rendelkező fehérjék szelektíven bontódnak le. Egy *chaperone* rendszer (Hsp70 fehérje) ismeri fel a KFERQ szekvenciát, majd az így kialakult *chaperone*-célfehérje komplex egy specifikus lizoszóma membránfehérjén (LAMP-2a; *lysosome-associated membrane protein-2a*) keresztül jut a lizoszóma lumenébe. Emlősökben figyelték meg, és úgy tűnik, hogy a makroautofágiát követő másodlagos sejtválasz része (Levine és Kroemer, 2008).



6. Ábra. Az autofágia fő formái. CMA: *chaperone*-közvetített autofágia. KFERQ: pentapeptid szekvencia. A sejtszervecskék és fehérjék nem méretarányosak.

A makroautofágia (mivel a továbbiakban csak ezzel az autofág folyamattal foglalkozom, ezért ezt az egyszerűség kedvéért a továbbiakban autofágiának nevezem) a mennyiségileg legjelentősebb autofág folyamat. E folyamat során a lebontásra kijelölt citoplazma részlet körül egy speciális kettős membrán struktúra (ún. izoláló membrán) formálódik, amely vezikulummá (autofagoszóma) záródik, és elhatárolja a lebontandó területet a citoplazma többi részétől (Opipari és mtsi., 2004). Az autofagoszóma később lizoszómával egyesül; az így keletkezett struktúrát autolizozómának nevezik (7. ábra). Az autofagoszóma mérete sejt- és fajfüggő, leggyakrabban 0,1-1 μm . Az autofagoszóma a lizoszómával nemcsak közvetlenül, hanem a heterofág eredetű endoszómával történő fúziót követően is egyesülhet.



7. Ábra. Makroautofágia. A rajz a makroautofág folyamat főbb lépéseit mutatja. Az izoláló membrán külső része pirossal, belső része késsel van jelölve. A mitokondriumokat és fehérjéket szürke gömbök jelölik. A jobb oldali képen felül egy élesztő vakuóla (nyíl) (a lizoszómának megfelelő sejt szervecske; fénymikroszkópos felvétel), alul egy *C. elegans* bélsejtéből származó autofág struktúra látható (elektronmikroszkópos felvétel). Az alsó képen a vonal 0,5 μm -t jelöl.

2.2.2. Az autofágia mechanizmusa

Fiziológiai, egyedfejlődési és orvosi biológiai jelentősége ellenére az autofágia mechanizmusa és szabályozása sokáig ismeretlen maradt. Ennek a hiányosságnak az oka viszonylag könnyen megmagyarázható: az autofagoszóma μm -es mérete miatt a folyamatot a korábbi évtizedekben (a molekuláris faktorok megismerése előtt) csak elektronmikroszkóppal tudták tanulmányozni. Ez a sajátosság megakadályozta a hatékony genetikai módszerekkel történő autofágia-specifikus gének és fehérjék azonosítását (nyilvánvaló, hogy senki nem vállalkozott elektronmikroszkópiára épülő mutáns *screen*ekre). Az áttörést az egysejtű élesztőben zajló autofágia tanulmányozása tette lehetővé (Studebaker és mtsi., 2005). Élesztőben ugyanis az autofág vakuólum (a lizoszómával analóg sejt szerv) fénymikroszkóppal is könnyen azonosítható. Ezt a felismerést genetikai *screen*ek sora követte, amelyek révén számos autofág faktort sikerült meghatározni. Az élesztő autofág gének (*ATG*) soksejtű ortológjainak meghatározásával megnyílt az út a folyamat molekuláris és funkcionális (genetikai) tanulmányozása előtt magasabb rendű szervezetekben is (Vellai és mtsi., 2009). Napjainkig több mint 30 *ATG* gént azonosítottak élesztőben, amelyek jelentős része nemcsak az autofágiában, hanem az ún. Cvt (*cytoplasm-to-vacuole targeting*) útvonalban is funkcionál (Timmons és Fire, 1998) (**1. Táblázat**).

1. Táblázat. A *C. elegans* autofág gének élesztő és humán ortológjai, valamint a kódolt fehérjék funkciói.

Élesztő gén	<i>C. elegans</i> ortológ	<i>C. elegans</i> ORF	A fehérje funkciója élesztőben
<i>ATG1</i>	<i>unc-51</i>	Y60A3A.1	Protein szerin/treonin kináz, szükséges az autofágia indukciójához.
<i>ATG2</i>		M03A8.2	Periférikus membrán fehérje, részt vesz az autofágoszóma kialakulásában, és az Atg9 reciklizációjához szükséges.
<i>ATG3</i>		Y55F3AM.4	E2-szerű enzim, az Atg8-foszfatidil-etanolamin konjugátum létrejöttéhez szükséges.
<i>ATG4</i>		ZK792.8	Cisztein proteáz, az Atg8 hasításáért felelős, szerepet játszik az autofágoszóma kapcsolódásában a mikrotubulusokhoz.
		Y87G2A.3	
<i>ATG5</i>	<i>atg-5</i>	Y71G12B.12	Az Atg12-Atg5 konjugációs komplex tagja.
<i>ATG6</i>	<i>bec-1</i>	T19E7.3	Az Atg14, Vps34 és Vps15 fehérjékkel alkot komplexet, részt vesz bizonyos autofág fehérjék reciklizációjában.
<i>ATG7</i>	<i>atg-7</i>	M7.5	A két konjugációs rendszer kialakulásához szükséges fehérje.
<i>ATG8</i>	<i>lgg-1</i>	C32D5.9	Az Atg8-foszfetidil-etanolamin konjugációs rendszer komponense, az autofágoszóma kialakulásáért felelős.
	<i>lgg-2</i>	ZK593.6	
<i>ATG9</i>	<i>atg-9</i>	T22H9.2	Az autofágoszóma kialakulásáért felelős transzmembrán fehérje, a mitokondrium és a preautofágoszóma között mozog.
<i>ATG10</i>		T18D3.4	E2-szerű enzim, az Atg12-Atg5 konjugátum kialakulásáért felelős.
<i>ATG12</i>	<i>lgg-3</i>	B0336.8	Az Atg5-Atg12 konjugátum tagja.
<i>ATG16</i>		F02E8.5	A PAS kialakulásában együtt működik az Atg12-Atg5 konjugátummal.
<i>ATG18</i>	<i>atg-18</i>	F41E6.13	Foszfatidil-inozitol-3,5-biszfoszfát-kötő fehérje, az Atg9 visszaforgatásában játszik szerepet.
<i>VPS34</i>	<i>let-512</i>	B0025.1a	Foszfatidil-inozitol 3-kináz, az Atg6 komplex része
<i>VPS15</i>		ZK930.1	Szerin/treonin protein kináz, az Atg6 komplex tagja

Az autofágia egy komplex folyamat, amely számos fehérje működését igényli (Klionsky, 2006). Az autofágia mechanizmusának számos részlete máig nem tisztázott. A folyamat kezdetén a sejt számára szükségtelessé vált alkotókat vagy a sejtbe került idegen

anyagokat az izoláló membrán elkülöníti a sejt többi részétől, így alakul ki az autofagoszóma (7. ábra). Az autofagoszóma később lizoszómával fuzionál, az így kialakult struktúrát autofagolizoszómának nevezzük. A kettős membránnal elkülönített citoplazma részlet tehát végül a lizoszómában bontódik le. Az autofagoszóma-lizoszóma fúziója során az autofagoszóma belső membránja nem kapcsolódik a lizoszóma membránjához, hanem egy különálló autofág testet képez a lizoszóma lumenében. Idővel az autofág test membránja is lebomlik, így lehetővé válik a benne található anyagok enzimatis lebomlása, és a keletkezett monomerek újrahasznosítása (Klionsky, 2006) (7. ábra).

Az autofagoszóma membrán eredete máig nyitott kérdés. Keletkezésének két fő elmélete van: az egyik felfogás szerint egy eleve létező membránstruktúrából származik, mint amilyen például a Golgi-aparátus vagy az endoplazmatikus retikulum (ER), egy másik felfogás szerint a citoplazmában újonnan (*de novo*) szerelődik össze a jelenlévő prekursorokból (Levine és Yuan, 2005). Az utóbbi évben evidenciát találtak arra, hogy autofág struktúrák formálódnak a mitokondriális membránból (Vellai és mtsi., 2009) ill. az endoplazmatikus membrán ciszternáiból (Mizushima és Levine, 2010).

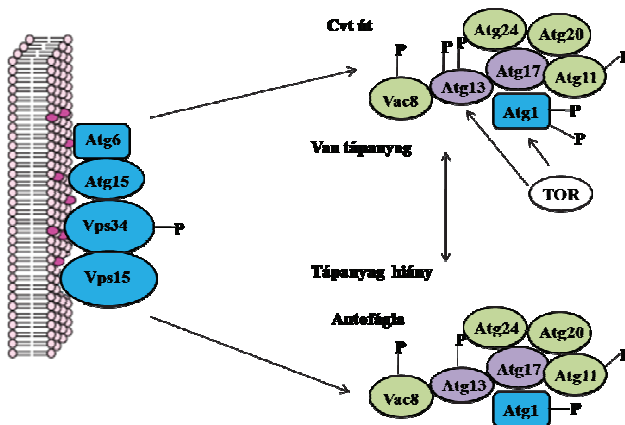
2.2.2.1. Az autofágia indukciója

Az autofágia indukciójában az eukarióta sejtek energia szenzoraként működő TOR (*target of rapamycin*) kináz kulcsszerepet játszik. A TOR egy Atg1 kináz komplexet gátol. E komplexbe tartoznak még az Atg13, Atg17 és Atg11 fehérjék. A TOR foszforilálja az Atg13-at, így az nem képes foszforilálni az Atg1-et (Klionsky, 2006). Az inaktív Atg1 pedig nem képes autofágiát iniciálni. Ha a TOR-t rapamicinnel vagy éhezéssel gátoljuk, az Atg13 fehérje részlegesen defoszforilálódik, és ennek hatására – az Atg1-en keresztül – az autofágia indukálódik (8. és 9. ábra).

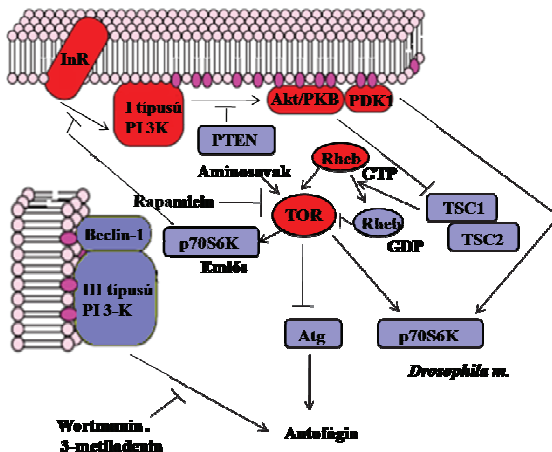
Egy másik szabályozási úton a TOR különböző effektor fehérjék (pl. Tap42, Sit4, Ure2) foszforilációját szabályozza. Ezek az effektorok az autofágiához nélkülözhetetlen fehérjék transzkripcióját vagy translációját szabályozzák.

2.2.2.2. Vezikula nukleáció

A kialakuló kettős membrán szintézisét egy „membrán készítő” Vps34 fehérje komplex végzi, melynek fő komponense (innen a név) a Vps34 nevű kináz. E komplex tagja még a Beclin-1 (élesztőben Atg6) fehérje is. A nukleációs folyamat csak akkor indul be, ha a multiprotein komplex nem kapcsolódik egy gátló fehérjéhez, a BCL2/BCL-XL-hez (Klionsky, 2006).



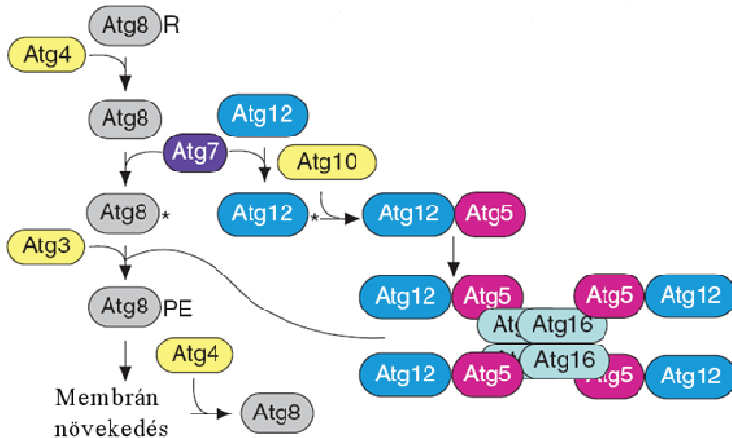
8. Ábra. Az autofágia indukciója élesztőben. Az autofágia indukcióját a TOR kináz gátolja. A TOR az Atg13 fehérjét foszforilálja, ezáltal gátolva annak Atg1-hez történő kötődését. Az autofágiához szükséges fehérjék lilával, a Cvt (Cytoplasm-to-vacuole targeting) útvonalhoz szükségesek pedig zölddel vannak jelölve. A P foszfát csoportot jelöl.



9. Ábra. Az autofágia indukciója emlősökben. Az autofágia kezdeti lépéseiben résztvevő fehérjék részben eltérnek az élesztőben megfigyeltektől, de a TOR-kináz itt is kiemelt szerepű az autofágia szabályozásában. A TOR és inzulin/IGF-1 szignál transzdukciós rendszerek egy szabályozási tengelyt alkotnak az autofágia szabályozásában. E tengely ponton is szabályozza az autofág faktorok működését.

2.2.2.3. Vezíkula elongáció

A növekvő autofagoszóma membrán egyik fő komponense az ubiquitin-szerű LC3 (élesztőben Atg8) fehérje. Az LC3 membránba épülési folyamata meglehetősen összetett, számos fehérje közreműködését igényli. A citoplazmában szolubilis LC3 (LC3-I vagy Atg8-R) utolsó aminosavát (glicin) egy Atg4 cisztein proteáz enzim lehasítja. Az így csonkolt LC3 az Atg7 ubiquitin aktiváló fehérje segítségével aktiválódik (**10. ábra**). Az Atg7 szükséges egy ubiquitináló fehérje komplex aktiválódásához is, amelyben az Atg12, Atg5 és Atg16 fehérjék kapcsolódása teszi lehetővé az LC3/Atg8 konjugálódását egy foszfatidil-etanolamin (PE) molekulával. Ezt a konjugációs reakciót az ubiquitin konjugáló Atg3 enzim katalizálja. Az Atg-PE (LC3-II) forma már membránkötött, speciálisan jelöli meg az autofagoszóma membránt (Klionsky és Emr, 2000).

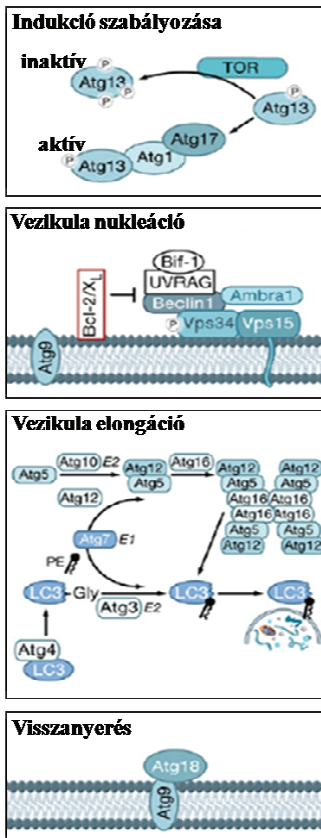


10. Ábra. Az LC3/Atg8 aktiválódása Az autofagoszóma membrán egyik fő komponense az Atg8 (emlősben LC3) fehérje, amely citoplazmában oldott formából az (LC3-I) Atg7, Atg3 és Atg12-Atg5 komplex segítségével oldhatatlan, membránkötött Atg8-PE (LC3-II) formává konvertálódik.

2.2.2.4. Autofagoszóma és lizoszóma fúziója

Az autofagoszóma fúziójában a kettős membránon lévő fehérjék vesznek részt. Ezek közé tartoznak az Atg12-Atg5-Atg16 komplex komponensei. A vakuólum-lizoszóma fúzió akkor következik be, amikor az Atg8-PE molekulák lekerülnek az autofagoszóma külső

membránjáról. A fúzió folyamatában sok fehérje játszik szerepet. Ilyenek pl. a SNARE fehérje család tagjai (Vam3, Vam7, Vti1, Ykt6, Rab és Ypt7). A fúzió után a lizoszómába került autofagoszóma tartalom különböző proteázok hatására lebontódik. Emlősökben ilyen enzimek például a lizoszómális cisztein proteázok és a katepszin (Klionsky, 2006) (11. ábra).



11. Ábra. Az autofágia folyamataiban résztvevő fehérjék (összefoglaló ábra). Az autofágia több részfolyamatra osztható: indukció, vezikula nukleáció, membrán növekedés (szekvesztráció) és visszanyerés. Az ábra az egyes folyamatokban résztvevő kulcsfehérjéket ábrázolja.

2.2.3. Az autofágia szabályozása

Az autofágiát konzervált jelátviteli mechanizmusok szabályozzák. A legfontosabb autofágiát szabályozó faktorok közé a TOR (*target of rapamycin*) kináz, az I. és III. típusú foszfatidil-inozitol kinázok, az inzulin/IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) útvonal transzkripciósi faktora (FoxO) és a Ras/Raf/ mitogén-aktivált protein kináz kináz (MAPK) tartoznak (Levine és Yuan, 2005; Legakis és mtsi., 2007). Megfelelő táplálék ellátottság mellett és növekedési faktorok jelenlétében a TOR kináz és az I. típusú foszfatidil inozitol kinázok gátolják, a III. típusú foszfatidil inozitol kinázok és a MAPK pedig aktiválják az autofág folyamatot (12. ábra).

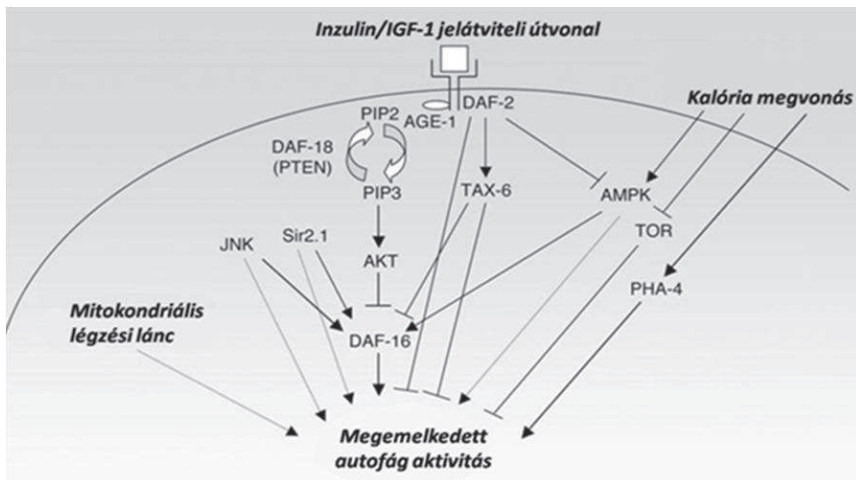
Táplálékgazdag körülmények között a TOR kináz foszforilálja *Atg13*-t, amely így kis affinitással kötődik az Atg1 fehérjéhez. Táplálékhiányos körülmények között - vagy rapamycin jelenlétében - a TOR kináz nem foszforilálja az *Atg13*-at, amely így defoszforilált állapotban marad és kötődik Atg1-hez. Ez a komplex indukálja az autofág lebontást.

Az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonal szintén részt vesz az autofágia szabályozásában. Az útvonal konzervált kinázai gátolják a FoxO transzkripciósi faktort (*forkhead transcription factor*). *C. elegans*ban az inzulin/IGF-1 receptor (DAF-2, *dauer formation defective-2*) befolyásolja a sejtnövekedést, az egyedfejlődést és az öregedési folyamat rátáját. Az autofág gének aktivitása a DAF-2-től függ. Az autofág rendszer tehát DAF-2-től *downstream* működik. Nem meglepő, hogy az autofág gének aktivitása szükséges a *daf-2(-)* mutánsok hosszú életidejű (*long-lived*) fenotípusához (Meléndez és Levine, 2003). Az autofágia és az inzulin/IGF-1 útvonal kapcsolata molekuláris szinten emlősökben sokkal szorosabb. Különböző sejtekben a FoxO transzkripciósi faktor közvetlenül szabályozza néhány autofág gén átírását (Vellai és mtsi., 2009).

A JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) és TGF- β (*transforming growth factor-beta*) jelátviteli útvonalak szintén befolyásolják az öregedést *Drosophilában*, *C. elegans*ban és emlősökben (Vellai és mtsi., 2009). *C. elegans*ban a JNK útvonal hiperaktivitása vagy a TGF- β csökkent aktivitása élethosszt növel, és ezt a hatást a DAF-16/FoxO közvetíti. A DAF-16/FoxO kapcsolja tehát össze az inzulin/IGF-1, TGF- β és JNK útvonalakat az autofágiával az öregedés szabályozásában (Tóth és mtsi., 2008).

A Ras-PKA (*cAMP-dependent protein kinase A*) útvonal szintén befolyásolja a sejtosztódást, a sejtes stresszválaszokat és az öregedési folyamatot. Élesztőben Ras-PKA

mutációi vagy a hiperaktív mitogén aktivált fehérje (MAP) kináz ERK2 megnöveli az élethosszt. Humán sejtvonalakban a Ras útvonal a MAP kinázon keresztül indukál autofágiát. Élesztőben három autofág gént, az Atg1-et, az Atg13-at és az Atg18-at gátolja PKA-t; a Ras-PKA útvonal tehát közvetlenül szabályozza az autofág degradációt. A PKA konstitutív aktivitása még éhezési viszonyok mellett is képes gátolni az autofágiát. A Ras-PKA élethosszt befolyásoló hatását az autofág gének közvetítik (Mizushima és mtsi., 2008).



12. Ábra. Az autofágia szabályozásában résztvevő faktorok *C. elegans*-ban. Táplálék-megvonás hatására a TOR kináz gátolja, az AMPK (*activated protein kinase*) és PHA-4 (*defective pharynx development*) kinázok pedig aktiválják az autofágiát. Az inzulin jelátviteli útvonal a DAF-16-on és JNK kinázon keresztül fejtik ki hatásukat.

2.2.4. Az autofágia szerepe a fejlődésben és betegségekben

Napjainkig az autofágia három fő egyedfejlődési funkcióját írták le. Részt vesz i) a sejtméregként ható károsodott makromolekulák és organelumok citoplazmából történő eltávolításában, valamint az öreg fehérjék lebontásában (ez utóbbi funkciója teszi lehetővé a fehérje homeosztázis fenntartását) – a folyamat hiánya degeneratív elváltozásokat (neurodegeneráció, izomsorvadás) és korai öregedést indukál (Rubinstein és mtsi., 2004); ii) a sejt differenciációt közvetítő fehérjék eltávolításában – hiánya meggátolja a csírvonal-szóma szétválást *C. elegans*-ban (Levine és Yuan, 2005), illetve az anyai hatású faktorok eltávolítását korai (4 sejt) emlős embriókban (Meijer és Codogno, 2004); és iii) bizonyos

sejtek egyedfejlődési programra történő eltávolításában (autofág sejthalál) – a folyamat hiánya meggátolja bizonyos lárvális szervek lebomlását a *Drosophila* metamorfózis során (Berry és Baehrecke, 2007)

Emlősökben a korai egyedfejlődés két szakaszában is fontos szerepet játszik az autofágia: először az implantáció előtti szakaszban közvetlenül a petesejt megtermékenyítése után, utána pedig a korai posztnatális (születés utáni) szakaszban, miután megszűnik a magzat köldökzsinóron keresztül történő táplálása (Mizushima és Levine, 2010). Az autofágia fontos szerepet játszik továbbá a vörösvértestek és az adipociták differenciációja során is, amikor szintén alapvető sejt szerkezeti változások mennek végbe. Az autofágia részt vesz továbbá a limfociták kialakulásában is. Az autofágia fehérje homeosztázisban betöltött szerepe megakadályozza a poszt-mitotikus sejtek degenerációját az embrionális fejlődés és a születési utáni élet során (Mizushima és Levine, 2010).

Emberben az autofágia abnormális működése számos degeneratív elváltozásban kimutatható. A folyamat hiánya szorosan összefügg egyes neurodegeneratív betegségek kialakulásával (Parkinson-, Huntington kór és Alzheimer kórok) (Fimia és mst., 2007; Mizushima és mst., 2008; Kroemer és Levine, 2008). Néhány ráktípusban bizonyos autofág fehérjék alacsony expressziós szintje figyelhető meg (Liang és mst., 1999; Yu és mst., 2004). Humán emlőtumorkban például a Beclin 1 autofág fehérje szintje jóval alacsonyabb, mint a normális szövetekben. Az emlős Beclin 1 fehérje az élesztő *Atg6* autofág fehérje homológja. A Beclin 1 képes kapcsolódni a Bcl-2 antiapoptotikus fehérjével (Miauri és mst., 2007; Pattingre és mst., 2005), így rákban betöltött szerepe a sejthalál szabályozásán keresztül is érvényesülhet. Közelmúltban végzett kutatások mutattak rá, hogy az autofág aktivitás képes a kontrollálatlan sejtnövekedést és sejtosztódást megállítani (Kroemer és Levine, 2008). Az autofágia gátlása vagy indukálása potenciálisan hatásos lehet egyes neurodegeneratív betegségek gyógyításában is (Shintani és Klionsky, 2004; Vellai és mst., 2009).

2.2.5. Az autofágia és apoptózis kapcsolata

Az autofágia és az apoptózis több ponton kapcsolódik molekulárisan. Az egyik ilyen pont emlősökben a Beclin-1 és Bcl-2 fehérjék fizikai kapcsolata (Pattingre és mst., 2005). A két molekula ortológja megtalálható *C. elegansban* is, BEC-1 és CED-9, és ezek is képesek

fizikailag kötődni egymáshoz (Takács-Vellai és mtsi., 2005). Emlősökben és *C. elegans*-ban a Bcl-2/CED-9 anti-apoptotikus hatása. A *Bcl-1* gén csendesítése emlős sejtekben az éhezési stressz-hatásra bekövetkező apoptózist fokozza (Meijer és Codogno, 2004). Míg a Beclin-1 és Bcl-2 fehérjék interakciója autofágiát gátol, addig *C. elegans*-ban az ortológ fehérjék kapcsolata apoptózist indukál (Takács-Vellai és mtsi., 2005). E megfigyelések arra engednek következtetni, hogy az apoptotikus és autofág útvonalak a Beclin1/BEC-1 fehérjén keresztül kapcsolódnak egymáshoz.

A p53 – mint apoptózist indukáló fehérje – különböző stressz-hatásokra aktiválódik. DNS károsodás hatására pl. különböző pro-apoptotikus fehérjék (PUMA, BAD, BIM, BID, stb.) segítségével képes a mitokondrium membránjának permeabilitását megváltoztatni és apoptózist indukálni (Schultz és Harrington, 2003). Bizonyos esetekben az aktivált p53 fehérje egy transzkripció programot indukál, amely autofág vakuólumok felhalmozódását eredményezi. Mindezt egy lisozómális enzimén keresztül történik meg, amelyet DRAM-nak (károsodás-szabályozó autofágia modulátor) hívnak (Maiuri és mtsai., 2007). Az autofág folyamathoz a p53 fehérje mellett szükséges a DRAM (damage-regulated autophagy modulator) jelenléte is (Crichton és mtsi., 2006).

Az apoptózis alap fehérjeinek gátlása (BAK, BAX, kaszpázok) esetén autofágia indukálódik (Maiuri és mtsai., 2007). A lecsökkent intracelluláris metabolit koncentrációt a sejtek stressz jelként érzékelik és az apoptózis gátlása miatt beindult autofágia megvédi őket a pusztulástól. Az autofágia ebben az esetben katabolikus folyamatként funkcionál és a makromolekulák lebontásával tápanyagot mozgósít, ezzel feltölti az éhező sejt energia tartalékait és megmenti a pusztulással végződő bioenergetikai katasztrófától (Shimizu és mtsi., 2004). Számos példa van az ellenkező esetre is, amikor az apoptózis kizárólag az autofágia gátlása miatt indukálódik. Az autofágia gátlása egy gyorsított sejt pusztulást eredményez, amely az apoptózis jellemzőit mutatja: kondenzálódott kromatin, a külső mitokondrium membrán permeabilizálódik, kaszpázok aktiválódnak. Az autofágia korai gátlása esetén (*beclin-1*, ATG5, ATG10, ATG12, VPS34 gátlásakor) nem képződnek autofág vakuólák és a sejt tipikus I. típusú sejthalállal pusztul el. Az autofágia késői gátlása esetén, abban az esetben ha az autofagoszóma- lisozóma fúzió blokkolt, akkor autofág vakuólák halmozódnak fel a sejtben és a sejt pusztulás előtt az I és a II típusú sejthalál kevert fenotípusa figyelhető meg. Fontos megjegyezni, hogy az autofágia gátlása nem mindig okoz apoptózist, egyes esetekben a sejtek mikronukleációval vagy nekrozissal pusztulnak el.

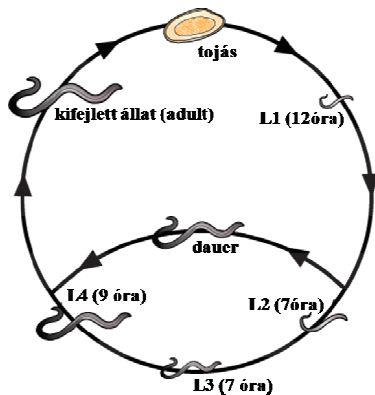
Ugyanazon stressz faktorok indukálhatnak apoptózist is és autofágiát is. Az adott faktor érzékenységi szintje és az iniciáló stimulus fajtája határozza meg, hogy melyik fajta sejthalál fog beindulni. A választást az is befolyásolja, hogy a két katabolikus folyamat bizonyos szinten közös szabályozás alatt áll. Táplálék hiányában az autofágia élvez előnyt, mert energiát biztosít a sejtnek, ez antiapoptotikus hatású. A sejt túlél, ha sikerül eltávolítani a károsodott sejtalkotót, a homeosztázis felbomlása esetén viszont késleltetett apoptózis indul (Mizushima és mtsi., 2008). Egyes esetekben sejt szinten autofágia- apoptózis kevert fenotípus is megfigyelhető. Az autofágia az esetek többségében lehetővé teszi a sejtek számára a stressz helyzetekhez való alkalmazkodást, de az erőteljes autofágia meg is ölheti a sejteket. A DNS károsodás vagy a sejthalál receptor aktiváció viszont apoptózist indukál és ezzel egyidőben gátolja az autofág választ.

DAPK egy kalcium/kalmodulin által szabályozott Ser/Thr sejthalál indukáló kináz. Szabályozza a különböző stimulusok (pl. interferonok által aktivált Fas/CD95 receptorok, TNF, TGF) által beindított I típusú apoptózist is és a II típusú autofág sejthalált is. DAPK-val egy családba tartozó egyéb fehérjék (DAPK kapcsolt protein kináz-1, ZIP kináz) is szabályozhatják mindkét fajta sejthalált (Jin és mtsi., 2002).

2.3. A *Caenorhabditis elegans*, mint genetikai modell rendszer

A *Caenorhabditis elegans* fonalféreg fajt az 1970-es évek közepe óta használják széles körben biológiai kísérletekben soksejtű modell rendszerként (Brenner, 1974). Mint laboratóriumi objektum, számos kedvező tulajdonsággal rendelkezik: kis méretű (1,2 mm hosszú), egyszerű felépítésű, laboratóriumban könnyen fenntartható műanyag petri agar lemezekon, életciklusa viszonylag rövid (~10 nap szobahőmérsékleten), speciális ivari dimorfizmusa van (önmegtermékenyítő hermafrodita és hím állatok alkotják a populációkat) és genomja viszonylag kis méretű. Fénymikroszkóp alatt transzparens testfala lehetővé teszi az egyedfejlődés egyedi sejtszinten történő vizsgálatát; sejtjeinek leszármazása (*cell lineage*) invariáns és meghatározott (Sulston és Horvitz, 1977). Genomja, amely az elsőként megszekvenált soksejtű genom, kb. 19700 gént tartalmaz (Horvitz, 2003). A *C. elegans* gének 70%-nak van humán ortológja. A *C. elegans* gének és fehérjék funkciójának meghatározása mind a mai napig tart. Eddig hozzávetőleg 7000 gént jellemeztek mutáns allélekkel.

A *Caenorhabditis elegans* a mérsékelt égövi területek talajában szabadon élő fonalféreg faj. Talajlakó baktériumokkal táplálkozik. Megfelelő táplálékellátottság mellett 25°C-on három nap alatt fejlődik ki az ivarérett állapot (Hosfield és mtsi., 2001). A fejlődő embrió miután kikel, négy lárváállapoton (L1-L4) keresztül fejlődik felnőtt stádiumba. A lárvastádiumokat vedlési szakaszok határolják el, amely alatt az állat nem mozog, nem táplálkozik, garatműködése leáll. Kedvezőtlen körülmények között egy alternatív lárvastádiumba (ún. dauer lárvá) fejlődik. Ebben az állapotban az állat tartaléktápanyagait használja fel, nem mozog, ellenálló kutikula borítja és akár fél évig is él. Kedvező körülmények között a dauer lárvá L4 stádiumú lárvává alakul és folytatja a normális (reproduktív) növekedési ciklust (13. ábra).



13. Ábra. A *C. elegans* életciklusa 25°C-on. A tojásból L1 lárvá fejlődik. Ez az állapot 12 óráig tart. L1 állapotból L2 lárvá lesz, ez 7 óráig tart. L2 lárvá L3 stádiumúvá alakul, amely szintén 7 óráig tart. L3 lárvából L4 stádiumú lárvá alakul ki, amely 9 óráig tart és kialakul a kifejlett petézni képes állat. Kedvezőtlen körülmények esetén L1 lárvá állapotból egy nyugalmi dauer lárvá állapotba mennek át az állatok. A körülmények megváltozása esetén L4 lárvá állapotban folytatódik tovább a fejlődésük.

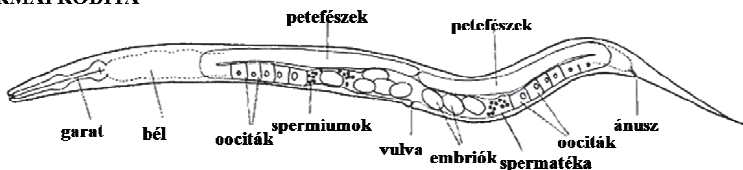
A hermafrodita állat (XX ivari kromoszóma kariotípus) élete során 250-300 petét képes lerakni. A hímek (XO kariotípus) meiotikus kromoszóma szét-nem-válás (*non-disjunction*) eredményeként alakulnak ki ~0,2%-os gyakorisággal. Ha a hímnős egyed hímmel párosodik, akkor az idegen spermium előnyt élvez a sajáttal szemben, és ilyenkor akár 1000 darab embrió is képezhet élete során (Brenner, 1974) (14. ábra).

A hermafrodita állat egyedfejlődése során összesen 1030 testi sejt keletkezik, ebből 131 apoptózissal elpusztul (Horvitz, 2003). A felnőtt hermafrodita teste tehát 959 sejtől áll. A hím állat teste 1031 sejtől áll. Genomja 100 Mb nagyságú, közel 20000 gén alkotja. A

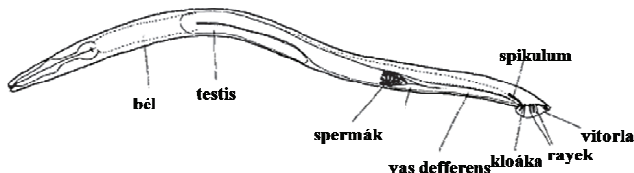
kutatások eredményeit internetes adatbázisokba rendezik (www.wormbase.com). A nemzetközi törzsgyűjtemény (CGC: *Caenorhabditis elegans* Genetic Center) bárki számára elérhető forrás. Funkcionális vizsgálatokat mutáns allélok és RNS interferencia használatával végeznek (Plasterk, 2002).

C. elegans kutatásokon elért eredményeikért 2002-ben Sydney Brenner, John Sulston és Robert H. Horvitz, 2006-ban Andrew Z. Fire és Craig C. Mello orvosi, illetve Martin Chalfie 2008-ban kémiai Nobel-díjat kaptak.

HERMAFRODITA



HÍM



14. Ábra: A *Caenorhabditis elegans* ivari dimorfizmusa. A felső ábrán a hermafrodita állat, az alsó ábrán pedig a hím állat felépítése látható. Jól megfigyelhetőek a két nem közötti anatómiai és méretbeli különbségek.

2.4. A dUTPáz

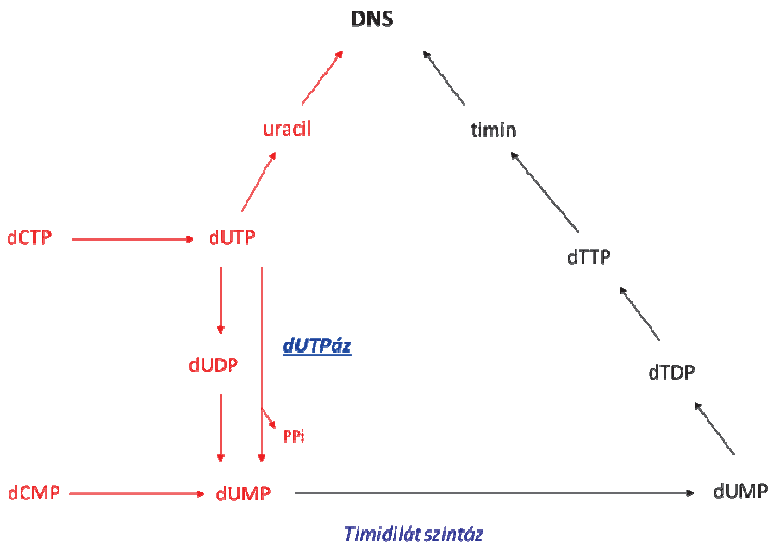
Sejtpusztulást számos farmakológiai és genetikai eszközzel lehet indukálni. E beavatkozások egyik fő molekuláris szintere a DNS perkurzorok szintézise, amelyben a dUTPáz enzim központi szerepet játszik. A dUTPáz (deoxyuridin trifoszfát nukleotidhidroláz) a 2'-deoxiuridin, 5'-trifoszfát (dUTP) hidrolizését katalizálja 2'-deoxiuridin, 5'-monofoszfáttá (dUMP) és pirofoszfáttá (**15. ábra**). Ezzel egyidejűleg eltávolítja az uracil előanyagát (dUTP) a sejtől és szubsztátot biztosít a *de novo* timin szintézis számára (Ladner, 2001). Az enzimaktivitás hiányában nem képződik timin, (megnö a dUTP/dTTP sejten belüli aránya), és ezért dUTP épül a DNS-be. Normális esetben a DNS nem tartalmaz uracilt. A DNS-be épült uracil az egyik leggyakoribb genotoxikus hiba, amelyet a DNS bázis kivágó javító rendszere észlel. Ennek központi enzime az uracil DNS

glikoziláz (UDG) kivágja a hibásan beépült dUTP-t és dTTP-t épít a helyére (Carradonna és Muller-Weeks, 2001). Ha sok dUTP épül a DNS-be, egy idő után a javító mechanizmus kapacitása kimerül. Idővel felszaporodnak a hibásan beépült bázisok és a kivágott üres helyek a DNS-ben. Ennek eredményeként kettős száltörések jönnek létre a DNS-ben, és megnövekszik a rekombinációs ráta. A szabad DNS végek programozott sejthalált indukálnak, a sejt tehát elpusztul. Ezt a folyamatot nevezzük timin mentes sejthalálnak (Ladner, 2001).

Az utóbbi években részletesen tanulmányozták az enzim fontosságát vírusokban, valamint prokarióta és eukarióta élőlényekben (McGeehan és mtsi., 2001). A fehérje normális működése minden vizsgált élőlény számára alapvető az életben maradáshoz. Az enzim egyedisége és evolúciós konzerváltsága ellenére néhány vírus – a különböző herpesz- és retrovírusok - saját dUTPáz kódol (Priest és mtsi., 2006). A nem osztódó gazdasejtekben a vírus genomban előidézett dUTPáz mutációkkal csökkenteni lehet a vírus fertőzőképességét. Emiatt az enzim a vírus ellenes gyógyszerek kifejlesztésének egyik ígéretes új célpontjává vált.

Az dUTPáznak két izoformája létezik a sejtben: egy mitokondriális (DUT-M) és egy sejtmagi (DUT-N) forma (Ladner és mtsi., 2000). Mindkettő ugyanarról a génről képződik alternatív 5' exonokat felhasználva. DUT-N mérete 22 kDa, DUT-M 23 kDa. A két alegység felépítése nagyon hasonló, csak egy rövid terminális aminosavban különböznek. A DUT-N-ben a szerin foszforilált a konszenzus ciklin-függő fehérje kináz foszforilációs helyen (Ser11 DUT-N). Ez a fehérje sejtciklus szabályozásban betöltött szerepére utalhat.

A dUTPáz expressziójáról magasabbrendű eukariótákban nagyon keveset tudunk. Növényeken végzett kísérletekből kiderült, hogy az expressziója proliferációhoz kapcsolódik (Ladner, 2001). A legnagyobb aktivitást a virág és a vegetatív merisztémák mutatták. A dUTPáz proliferációhoz kapcsolódó expresszióját később humán limfocita sejtekben is megerősítették (McGeehan és mtsi., 2001).



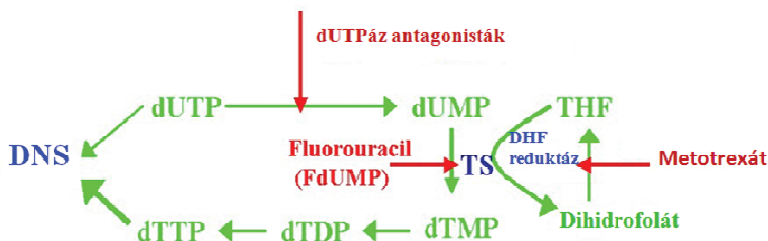
15. Ábra. A dUTPáz enzim funkciója. Az enzim katalizálja dUTP hidrolízisét dUMP-vé és pirofoszfáttá. Így eltávolítja az uracilt és megfelelő mennyiségű szubsztátot biztosít a timidilát szintáz számára. Ha a folyamatban a dUTP kerül túlsúlyba, akkor uracil épül a DNS-be. A dUTPáz megfelelő működése esetén a timidilát szintáz dUMP-t dTDP-vé, majd dTTP-vé alakítja, és végül timin keletkezik.

2.4.1. A dUTPáz szerepe a rákterápiában

A DNS metabolizmusban betöltött alapvető szerepe miatt a dUTPáz a rákellenes gyógyszerkutatások egyik új fő célpontjává vált. Ezen gyógyszerjelöltek hatásmechanizmusa a timin metabolizmus fő lépéseit végző enzimek gátlására épül (Longley és mtsi., 2003). Többnyire membránon áthatolni képes dUTPáz analógokat használnak (pl. 5-fluorouracil, fluorodeoxyuridin és ZD1694). Ezek képesek gátolni az enzim működését. Az antagonizmák a dTTP szint csökkentésén vagy a dUTP szint emelésén keresztül okoznak sejthalált (Koehler és mtsi., 2004).

A TMP (timidin monofoszfát) bioszintézise úgy történik, hogy a timidin-szintáz (TS) metilálja a dUMP-t, amely azután TTP-vé (timidin trifoszfát) alakul, és ez már közvetlenül a DNS szintézis alapanyaga (15. ábra). Ezen reakció metil donora a metiléntetrahidrofolát (MTHF) oxidálódik dihidrofoláttá (DHF). A TMP szintézis során a MTHF megfelelő szintjét a dihidrofolát redukáz (DHFR) és a szerin hidroximetiltranszferáz (SHMT) enzimek együttes

hatása biztosítja. A timin szintézishez szükséges dUMP mennyiség két forrásból származik: dCMP deoxicitidilát deamináz (DCD) általi deaminációjából és az UDP ribonukleozid difoszfát reduktáz (RNR) általi redukcijából. Az RNR reakció során keletkezett dUDP-t a nukleozid difoszfát kináz (NDP kináz) dUTP-vé foszforilálja és ezt a deoxiuridin trifoszfát nukleotido hidroláz (dUTPáz) gyorsan dUMP-vé hidrolizálja. A timidin kináz (TK) segíti elő a timin nukleotidok vágási lépését (Pugacheva és mtsi., 2002). A TS reakció gátlói a rákellenes gyógyszerek fluoropirimidin osztályból kerülnek ki. Ezek közé tartozik az 5-fluorouracil (5-FU), fluorodeoksiuridin (FdR) és az új 5-FU hatóanyagok, mint például a xelodin (capecitabine) (16. ábra). Ezek az anyagok úgy gátolják a TMP bioszintézist, hogy tercier komplexet képeznek az aktív metabolit (FdUMP), a metil donor (MTHF) és a TS enzim között (Studebaker és mtsi., 2005).



16. Ábra. DNS metabolizmust befolyásoló tumorgátló gyógyszerek működési mechanizmusa. A dUTPáz antagonisták gátolják az enzim tevékenységét. Így az uracil szubsztrát kerül túlsúlyba és uracil épül a DNS-be. Más anyagok a timidilát szintáz (Fluorouracil) vagy a dihidrofolát reduktáz (Metotrexát) gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat.

2.4.2. A *C. elegans* dUTPáz

A *C. elegans* genomban a *dut-1* gén kódolja a dUTPáz enzimet. Egy norvég csoport gátolta a gén működését RNSi kezeléssel (Denng és mtsi., 2006). A kísérlet 72%-os embrió letalitást eredményezett. Az életben maradt embriók (28%) lárváállapotba fejlődtek. Ezek a dUTPáz(RNSi) lárvák soványak és hosszúak, fejlődésük lassú, és csak 0,8%-uk éri el az L4 (utolsó) lárváállapotot. A duplaszájú RNS-sel kezelt állatok gonádjában megnövekedett mitotikus sejteket találtak, és ezek száma kevesebb volt, mint a kontroll állatokban. Ez a

pleiotróp fenotípus az ellenőrzési pont aktivációjára és a sejtciklus késleltetésre utal (Deng és mtsi., 2007). Ugyancsak megállapították, hogy a dUTPáz inaktiválás hatására p53-független apoptózis indukálódik.

A dUTPáz enzim hiányában a tévesen beépült dUTP-t kivágó javító mechanizmus fő komponense az uracil DNS glikoziláz *C. elegans* homológja az UNG-1 fehérje. Az és UNG-1 enzim megvonása *dut-1(RNSi)* genetikai háttérben részlegesen menekítette a gonád fejlődését, az állatok 3%-a képes volt normális oociták és spermiumok képzésére.

A sejtosztódás során a javító mechanizmusok mellett olyan faktorok is aktiválódnak (pl. CLK-1 és CLK-2; *clock abnormal protein*), amelyek felfüggesztik a sejtciklust, amíg a keletkezett hibák javítása folyik (Deng és mtsi., 2007). A *clk-2* és *ung-1* mutánsok jelenősen menekítik a dUTPáz RNSi fenokópiáját: az utódok 30%-a eléri a felnőtt kort, gonádjuk normálisan fejlődött. Ezek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az UNG-1 enzim általi dUTP kivágás és a CLK-2 ellenőrzési pont is szükséges a sejtciklus késleltetés és az apoptózis aktiválásához (Deng és mtsi., 2007).

3. CÉLKITŰZÉSEK

Az apoptózis során genetikai programra vagy induktív környezeti hatásra végső soron egy olyan fehérjebontó (kaspáz) rendszer aktiválódik, amely képes a sejt anyagainak jelentős részét degradálni, és a sejt pusztulását okozni. Az apoptotikus sejthalál teszi lehetővé a felesleges és kóros (pl. tumoros) sejtek eltávolítását a szervezetből. Az autofág önemésztő folyamat során a citoplazmának csak bizonyos részletei bontódnak le lizoszómális hidrolázok által. Az apoptózissal ellentétben az autofágia alapvető sejtteni funkciója tehát nem a sejt elpusztítása, hanem – éppen ellenkezőleg – a sejt életben tartása. Érdekes módon azonban az autofágia abnormális működése is számos rákos elváltozásban kimutatható. Ez felveti annak lehetőségét, hogy az autofágia szintén szerepet játszhat bizonyos sejtpusztulási folyamatokban. Orvosbiológiai és egyedfejlődési jelentősége ellenére az apoptózis és autofágia sejthalálban betöltött kapcsolatáról (doktori munkám kezdetekor) szinte semmit sem tudunk. Noha korábbi publikációk beszámoltak arról, hogy az autofág gének inaktiválása masszív apoptotikus sejthalál választ indukál emlős sejtenyészetekben és korai *C. elegans* embriókban (Crighton és mtsi., 2006; Takács-Vellai és mtsi., 2005), mások azzal érveltek, hogy ezekben az autofág-deficiens rendszerekben megfigyelhető apoptotikus sejtest felhalmozódás nem az apoptotikus sejthalál számának növekedéséből, hanem az apoptotikus testek heterofág (fagocitózissal történő) eltávolításának hiányából fakad, amely szintén autofág gének funkcióját igényli (Mizushima és mtsi., 2008).

A mai humán rákterápia egyik fő potenciális célpontja a dUTPáz nevű enzim (Ladner, 2001), amely a timin és uracil bioszintézis közti egyensúly fenntartásáért felelős. Az uracil nem természetes alkotója a DNS-nek. Ha a sejtben nincs elég dTTP, akkor azonban dUTP épül a DNS-be, amely DNS hibaként nyilvánul meg és idővel kimerítheti a sejt DNS javító kapacitását (az dUTP-k sorozatos kivágása végül DNS károsodáshoz vezet), amely végül a sejt pusztulását eredményezheti. Ezt a folyamatot timin mentes sejthalálként említi a szakirodalom (Ladner és mtsi., 2000), mechanizmusáról azonban igen keveset tudunk. A dUTPáz inaktiválása által indukált sejthalál modellt kívántuk elsődlegesen használni az autofágia sejtpusztulásban betöltött szerepének tisztázásához. Ehhez elsőként a dUTPáz kódoló gén jellemzését végeztük el *C. elegans*-ban. Kiemelten kívántuk vizsgálni a dUTPáz funkcióját az állat egyedfejlődésében. Mivel nem állt rendelkezésre dUTPáz-deficiens mutáns nematoda törzs, ezért a gén inaktiválását szekvencia-specifikus RNSi konstrukciók létrehozásával terveztük elvégezni. Ugyancsak fontos vizsgálati pontként határoztuk meg a

dUTPáz gén expressziós analízisét, amelyet különböző riporter konstrukciók és transzgénikus törzsek előállításával kívántunk megvalósítani.

Következő lépésként a dUTPáz deficiens állatokban megfigyelhető sejtpusztulási folyamatok citológiai leírását kívántuk elvégezni. Elektronmikroszkópos és GFP-alapú fluoreszcens fénymikroszkópiára épülő módszerek segítségével a sejtpusztulás természetét (mennyire apoptotikus vagy autofág eredetűek) terveztük jellemezni.

A kapott adatok tükrében célul tűztük megvizsgálni azt is, vajon a dUTPáz inaktiválása specifikus sejthalál típust indukál. Más szavakkal, dUTPáz-tól független sejthalál-indukáló faktorok alkalmazása esetén is megvizsgáltuk a sejtpusztulás típusát. Ehhez olyan farmakológiai és genetikai beavatkozásokat választottunk ki, amelyekről tudott volt, hogy potensen megakasztják az embrionális fejlődést. A genetikai faktorok közül a *ceh-13* (egy esszenciális HOX fehérjét kódol) és a *dlc-1* (a dinein könnyű láncot kódolja) génekre esett a választásunk. A farmakológiai beavatkozások közül az 5-FU és FUDR kezeléseket választottunk.

Az előzőekben leírt embrionális letalitást indukáló intervenciók esetében meg kívántuk vizsgálni, vajon az autofág rendszer transzkripcionálisan aktiválódik-e. Ehhez különböző translációs fúziós és transzkripcionális fúziós autofágia-specifikus riporter rendszerek vizsgálatát terveztük kontroll vs. kezelt/mutáns genetikai háttérű embriókban.

Az előző ponttal összhangban olyan konzervált transzkripciós faktor kötőhelyeket kívántunk keresni autofág gének szabályozó régióiban, amelyek potenciálisan alkalmasak az autofág gének expressziós aktiválására induktív körülmények közepette. Bioinformatikai módszerekkel *C. elegans* autofág gének promótereit összehasonlító módon terveztük jellemezni, és olyan kötőhelyeket szándékoztunk azonosítani, amelyek kapcsolatot biztosíthatnak az apoptotikus útvonal szabályozásával.

A potenciális találatok esetében *in vitro* kötőhely elemzést kívántunk megvalósítani. Ezért az *in silico* vizsgálatok által pozitívnak jelölt transzkripciós faktorokat szándékoztunk *in vitro* expresszálni, majd géletardációs vizsgálatokhoz alkalmazni, amelyekben jelölt oligonukleotidok tartalmazzák a potenciális kötőhelyeket.

Végül kettős mutáns (episztaízis) elemzést terveztünk annak kimutatása érdekében, hogy az autofág gének részt vesznek-e – és ha igen, hogyan – a *C. elegans* korai egyedfejlődésének szabályozásában. Apoptózis és autofágia deficiens egyszeres mutáns nematoda törzsek életképességét kívántuk vizsgálni, és összehasonlítani a megfelelő apoptózis–autofágia kettős mutáns törzsek életképességével.

4. ANYAGOK és MÓDSZEREK

4.1. Törzsek fenntartása

A *C. elegans* törzseket laboratóriumi körülmények között 15-25°C között, termosztátokban, petri lemezekbe öntött agaron lévő *Escherichia coli* baktériumpázsiton (a továbbiakban NGM lemezen) tartjuk. Az állatokat egyedileg platina tű segítségével rakjuk át egyik NGM lemezről a másikra. Nagyobb mennyiségű állat mozgását kisméretű spatula segítségével végezzük el az agar darab kivágásával és áthelyezésével. Stabil homozigóta mutációk esetében elég a törzseket 1-2 havonta frissíteni. Folyékony nitrogénben a törzsek akár évekig is tárolhatók.

1 liter NGM agar lemez elkészítése:

NaCl	3g
agar	17g
pepton	2,5g
koleszterol (5mg/ml EtOH-ban)	1ml
ddH ₂ O	975ml

Autoklávozás után a 60°C-ra hűlt médiumhoz sterilen hozzáadjuk a következő anyagokat:

1M CaCl ₂	1ml
1M MgSO ₄	1ml
1M pH6 KH ₂ PO ₃	25ml

Az így készült médiumot használjuk úgynevezett alaplemezként. Az RNSi kezelésekhöz esetében az agar elegyhez adunk 0,5 ml Tetracyclint (12,5 mg/ml), 0,5 ml Ampicilint (100 mg/ml), és 1 ml IPTG-t. A sejthalál-indukáló kísérletek esetében az elkészített NGM oldathoz megfelelő mennyiségű 5-FU-t, FUDR-t, és dUMP-t adtunk, hogy megkapjuk a használt 1 µM, 100 µM és 10 mM koncentrációjú oldatokat. A komponensek hozzáadása előtt célszerű vizes oldatot készíteni és steril szűrőn átengedni az anyagokat.

4.2. Használt törzsek

Escherichia coli törzsek:

OP 50: uracil auxotróf törzs, a férgek táplálására használjuk

HT 115 (DE3): RNS interferenciához használjuk negatív kontrollként (üres vektort tartalmaz)

Caenorhabditis elegans törzsek:

A vad típusú törzs a „Bristol (N2)” változatot jelenti

UL993, *dUTPase::lacZ*

UL994, *dUTPase::lacZ*
 BC13515 *atg-18::gfp, sls 13209, (dpy-5(e907))*
 buEx070 [*plgg-1::LGG-1::GFP + rol-6(su1006)*]
 swEx520 [*pbec-1::BEC-1::GFP+ rol-6(su1006)*]
 FR853 *bec-1(ok691)IV*
 FR854 *bec-1(ok700)IV*; buEx080 [*pbZipÄbec-1::gfp + rol-6(su1006)*]
 FR758 *swEx520 [pbec-1::BEC-1::GFP+ rol-6(su1006)]*
Ex[atf-2::gfp + unc-119(+)]; *unc-119(e2498)III*; *him-5(e1490)V*
sEx13209 [atg-18::gfp]
 NL2099 *rrf-3(pk1426)II*
 MT5816 *ced-4(n2273)III*
 MT2547 *ced-4(n1162)III*
 MT8352 *ced-3(n2439)IV*
 MT1522 *ced-3(n717)IV*
 MT4770 *ced-9(n1950)III*
 PB201 *ung-1 (Cr- ung-1(ld201))*
 VC172 *cep-1(gk138)I*
 JR1279 *cep-1(+)* *I*; *cep-1(w40)*
 XY1054 *cep-1(lg12501)I*
 FX00467 *atf-2(tm467)II*
 bu221 *atf-2(tm467)*; *gfp::lgg-1*
 CB1392 *nuc-1(e1392)X*
 bube01. *lin-8(n111)/lin-35(n745)*; *gfp::lgg-1(nEx998)*
 bubj12 *lin-15A(n767) X/lin-53(n833)I*; *gfp::lgg-1*
 bube03 *let-60(n1046)*; *gfp::lgg-1*
 MT1624 *lin-35(n745)I*; *lin-8(n111)II*
 MT10430 *lin-35(n745)I*
 MT111 *lin-8(n111)II*
 MT8842 *lin-56(n2728)II*
 MT765 *lin-15B(n765) nls51X*
 MT1806 *lin-15A(n767)X*

4.3. *C. elegans* embriók preparálása

Az embriók tömeges kinyerésére szolgáló módszer az ún. hipokloritos embriópreparálási eljárás (*bleaching*). Az eljárás háztartási hipó és 5M NaOH 2:1 arányú keverékével tárja fel a fiatal anyákban található, még teljesen fertőzésmentes petéket. Az állatokat steril deszt. vízzel lemossuk a lemeztől és lecentrifugáljuk 1500 rpm fordulatszámmal, hogy leülepedjenek a lemez alá. A felülúszó eltávolítása után hozzáadunk annyi hipokloritos oldatot, hogy ellepje az állatokat. A csövet folyamatosan rázogadjuk. Mikroszkóp alatt figyeljük az állatok állapotát. A férgek szétesése után rögtön lecentrifugáljuk (1500 rpm). A felülúszó eltávolítása után az embriókat háromszor átmoszuk deszt. vízzel.

4.4. RNS interferencia (RNSi)

C. elegans-ban az RNS interferenciával történő géncsendesítés történhet injektálással és ún. etetéses módszerrel. Csoportunk az etetéses módszert alkalmazta. A kiválasztott gén egy rövidebb (~1 kb) szakaszát tartalmazó vektort (pPD129.36) hordozó, a fonalférgek számára táplálékként szolgáló HT115-ös *E. coli* törzset, antibiotikumokat (Tetracyclin (12,5 mg/ml) és 0,5 ml Ampicilin (100 mg/ml)) tartalmazó folyékony tápoldatban (LB) növesztjük 12 órán át 37°C-on. A baktérium oldatot antibiotikum és indukáló anyagot (IPTG) tartalmazó lemezekre csepegtjük, és száradás után az állatokat a baktériumpázsra helyezzük.

1 liter LB tápoldat:

Élesztő kivonat	5 g
Trypton	10 g
NaCl	10 g
ddH ₂ O	1 l
Klázozás	

Az RNS interferencia vizsgálatokhoz használt agar összetétele:

NaCl	3 g
agar	17 g
pepton	2,5 g
koleszterol (5mg/ml EtOH-ban)	1 ml
ddH ₂ O	975 ml

Autoklázozás után a 60°C-ra hűlt médiumhoz a hozzáadjuk következő anyagokat:

1 M CaCl ₂	1 ml
1 M MgSO ₄	1 ml

1 M pH 6KH ₂ PO ₃	25 ml
100 mg/ml ampicillin	0,5 ml
100 mg/ml tetraciklin	0,5 ml
1M IPTG	100 ml

4.5. RNSi konstrukciók készítése

Az *C. elegans* adatbázisból (www.wormbase.com) származó szekvencia adatok alapján primereket tervezünk az inaktíválni kívánt gén 1 kbp-nyi szakaszára. Totál RNS-t izolálunk vad típusú törzsből és RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) segítségével amplifikáljuk fel az adott szakaszt. Az üres vektorba klónozzuk az izolált DNS darabot. A konstrukciót *E. coli* Z kompetens sejtekbe transzformáljuk, majd a transzformáns sejteket megfelelő szelekciós antibiotikumot tartalmazó lemezeke szelektáljuk. A kinőtt telepek közül néhányat felnövesztünk, plazmidot izolálunk belőle és tesztelésével ellenőrizzük a kívánt DNS szakaszunk jelenlétét.

A konstrukció készítésénél használt oligók:

dUTPase K07A1.2::RNAi:L: 5'-cat gcc atg gca tgt gtt ccg gct aat gga aaa c-3'

dUTPase K07A1.2::RNAi:R: 5'-cat gcc atg gca tgt cag cgc tgt aca aat cag c-3'

4.5.1. Totál RNS izolálás

- az állatok lemosása deszt. vízzel
- a felülúszó eltávolítása, végtérfogat 500 µl
- 2000 µl TRIZOL hozzáadása, összekeverés
- csövek lefagyasztása folyékony nitrogénben
- kiolvasztás folyó csapvíz alatt
- fagyasztás ismétlése háromszor
- az állatokat szétosztása két részre
- centrifuga: 14000 rpm, 10 perc, 4°C
- felülúszó átvitele egy új csőbe, 200 µl kloroform hozzáadása
- keverés után inkubálás szobahőmérsékleten 2-3 percig
- centrifuga: 14000 rpm, 15 perc, 4°C
- felülúszó átvitele új csőbe, 500 µl izopropanol hozzáadása
- keverés után inkubálás szobahőmérsékleten 10 percig
- centrifuga: 14000 rpm, 10 perc, 4°C
- vizes fázis eltávolítása

- csapadék mosása 100 µl 75%-os etanollal
- centrifuga: 14000 rpm, 15 perc, 4°C
- felülúszó eltávolítása és a csapadék megszáritása
- csapadék feloldása 30 µl DEPC vízben, inkubálás 10 percig 60°C-on
- kész RNS -70°C-on korlátlan ideig tárolható

4.5.2. RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction), (Roche)

PCR Mix összetétele:

- 1 µl RNS
- 5 µl 5x puffer
- 1,5 µl MgCl₂
- 1 µl *forward* primer (20 µl)
- 1 µl *reverse* primer (20 µl)
- 1 µl 10 mM dNTP
- 1 µl Taq polimeráz
- 2,5 µl DTT
- 11 µl DEPC víz

A használt PCR program:

- | | |
|---|------|
| 1. 50°C | 30'' |
| 2. 94°C | 2' |
| 3. adott <i>primereknek</i> megfelelő <i>annealing</i> hőmérséklet °C | 1' |
| 4. 72°C | 1' |
| 5. 93°C | 35'' |
| 35-ször ismételni a 3- 5. pontokat | |
| 6. 72°C | 10' |
| 7. 4°-on történő tárolás | |

4.5.3. A PCR termék izolálása agarból (Quiagen)

- agaróz gélen méret alapján elválasztott termék kivágása
- 15 µl QIAEX oldat és 1 ml QX1 puffer hozzáadása
- inkubálás 10 percig 50°C-on
- centrifuga: 13000 rpm, 2 perc
- felülúszó eltávolítása, majd 500 µl QX1 oldat hozzáadása, csapadék felszuszpendálása
- centrifuga: 13000 rpm, 1 perc
- felülúszó eltávolítása, 500 µl PE puffert hozzáadása, csapadék felszuszpendálása

- centrifuga: 13000 rpm, 1 perc
- felülúszó eltávolítása, 500 µl PE puffer hozzáadása, csapadék felszuszpendálása
- centrifuga: 13000 rpm, 1 perc
- felülúszó eltávolítása, csapadék megszáritása
- csapadékot feloldása 20 µl deszt. vízben

4.5.4. A DNS fragment ligálása RNSi vektorba (Roche)

- 4 µl emésztett DNS fragmentum
- 1 µl megemésztett vektor DNS
- 5 µl 2X puffer
- 1 µl T4 ligáz
- inkubálás egész éjszakán át 4°C-on

4.5.5. A kész konstrukció transzformálása baktérium sejtekbe

- 50 µl kompetens sejt inkubálása jégen 30 percig
- 2-3 µl ligátumot hozzáadása a sejtekhez
- inkubálás 5 perc jégen
- hősokk 37°C-on 1 percig
- inkubálás 2 perc jégen
- rázatás 1 óra, 37°C
- baktériumok kiszélesztése a megfelelő szelekciós antibiotikumot tartalmazó LB lemezre

4.5.6. Plazmid DNS izolálás Wizard Plus SV Minipreps (Promega) segítségével

- baktérium oldat inkubálása 12 óra, 37°C
- centrifuga: 2 perc, 9000 rpm
- felülúszó eltávolítása után a sejtek feloldása 250 µl *Cell resuspension solution*-ban
- 250 µl *Cell Lysis Solution* és 10 µl *Alkaline Protease Solution* hozzáadása
- inkubálás 5 perc szobahőmérsékleten
- 200 µl *Neutralisation solution* hozzáadása
- centrifuga: 10 perc, 12000 rpm
- felülúszót rátöltése az oszlopra és 750 µl *Column Wash Solution* hozzáadása
- centrifuga: 1 perc, 12000 rpm
- átfolyó eltávolítása, 200 µl *Column Wash Solution* hozzáadunk
- centrifuga: 1 perc, 12000 rpm
- átfolyó eltávolítása, 50 µl MQ víz hozzáadása

- centrifuga: 1 perc, 12000 rpm

4.5.7. Restrikciós emésztés és tesztemésztés

-4 µl DNS

-4,5 µl MQ víz

-1 µl 10X restrikciós enzim puffer

-0,5 µl restrikciós enzim

-inkubáció: időtartam és hőmérséklet a használt enzimtől függ

4.6. Fénymikroszkópos vizsgálatok

A fénymikroszkópos/fluoreszcens fotókat Olympus BX51 típusú fénymikroszkóppal készítettem. Tárgylemezre 4%-os agart cseppentettem (agarpad), majd az állatokat ráhelyezve M9 fiziológiás pufferrel, fedőlemezzel lefedtem. DIC optika segítségével készítettem a morfológiai képeket.

M9 oldat:

KHPO₄ 3 g

Na₂HPO₄ 6 g

NaCl 5 g

ddH₂O 1 l

Autoklávozás után 60°C-ra lehűtjük, és a médiumhoz hozzáadunk:

MgSO₄ 1M 1 ml

4.7. Embrió életképesség meghatározás

Körülbelül 20 állatot petéztettem 2 órán át szobahőmérsékleten (szinkronizálás). Amikor egy lemezen körülbelül 100 pete van, a felnőtt állatokat eltávolítjuk, majd leszámoljuk a petéket. Másnap, majd harmadnap újra számoljuk a petéket, a lárvákat és a túlélő állatokat. Sterilnek azt a petét tekintjük, amelyik „szétfolyik” a lemezen, és két nap után még mindig nem kel ki.

4.8. Vulva számlálás

A fénymikroszkópos módszernél leírtak szerint az állatokat agar rétegre helyezük M9 oldatban és lefedjük őket fedőlemezzel. Ezek az állatok nagyon sérülékenyek, bénító anyagok hatására kipukkadhatnak, ezért azt nem használunk. A lemezt láng felett áthúzzuk, ettől a férgek egy időre megbénulnak. A férgek hasi oldalán lévő vulva kitüremkedéseket megszámoljuk.

4.9. Élethossz mérés

dUTPáz RNS interferenciával kezelt állatok esetében az élethossz mérés eltért a hagyományos módszertől. Normális esetben az állatokat a mérés megkezdése sterilítást okozó anyagokkal kezeljük. A petezés megterhelést jelent és befolyásolja az élethossz mérést. A mi esetünkben nem kaptak előkezelést, mert a dUTPáz RNSi kezelés sterilítást okoz. Az alap NGM lemezen felnevelt állatokat L4 lárvá állapotban átrakjuk az RNS interferencia konstrukciót tartalmazó lemezekre. Minden nap megszámoljuk hány állat van életben, mennyi pusztult el. A kapott eredményeket statisztikai módszerekkel elemeztük. Minden kísérletet háromszor végeztünk el, és az ismétléseket G statisztikával vetettük össze.

4.10. Elektronmikroszkópia

Előkészítés: kiválasztjuk a megfelelő állatokat, ne legyenek fertőzöttek és ne leéhezett lemezzel származzanak, mert ezek a körülmények negatívan befolyásolják az eredményeinket. *Fixálás:* a kiválasztott állatokat 0,2%-os glutáraldehidet, 3,2%-os formaldehidet és 0,15M cacodylát puffert tartalmazó oldatban rögzítjük. Az állatokat 2-4 darabra vágjuk, hogy a rögzítőszer be tudjon jutni a sejtekbe. A rögzítést egy éjszakán át 4°C-on végezzük.

Mosás és kontrasztosítás: a rögzített állatokból a maradék fixáló szert a túlrögzítés elkerülése végett egy napig 0,1M cacodylát pufferes mosással távolítjuk el. Mosás közben a könnyebb kezelhetőség érdekében a mintákat megfestjük ruténium vörös festék hozzáadásával.

Beágyazás és metszés: a fixált mintákat agarba ágyazzuk és 0,5%-os cacodylát pufferes, OsO₄-os utófixálás és 0,2%-os uranil acetátos festés, majd felszálló etil-alkohol soros és végül propilén oxidos víztelenítés után azzal együtt beágyazzuk Durcupan műgyantába. Metszés a mintákat tartalmazó műgyantablokk kifaragása után az állatok hossz tengelyével párhuzamosan történik ultramikrotómmal. A metszeteket ólom-citráttal kontrasztosítjuk és JEM100CXII elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

4.11. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) festés (Roche)

- enyhe hipokloritos embriópreparálás (0,8M NaOH oldat)
- az utolsó mosás után az összes víz eltávolítása
- 640 µl fixáló oldat hozzáadása
- csövek inkubálása jégen 20 percig
- fagyasztás folyékony nitrogénben
- minták kiolvasztása
- inkubálás szobahőmérsékleten lassú forgatás mellett 20 percig
- centrifuga: 1500 rpm, 1 perc
- mosás 1 ml Triton-Tris pufferrel
- centrifuga: 1500 rpm, 1 perc
- mosás 1 ml PBST-B oldattal
- centrifuga: 1500 rpm, 1 perc
- felülúszó eltávolítása
- 1 ml PBST-B oldat hozzáadása
- inkubálás lassú forgatás mellett 15 percig
- felülúszó eltávolítása
- 50 µl TUNEL reakció oldat (Roche) hozzáadása
- inkubálás 37°C-on 60 percig
- mosás kétszer PBS oldattal
- férgek szétadagolása tárgylemezre, majd *vecta shield* oldat pipettázása
- fénymikroszkóp alatt az eredmény kiértékelése

Fixáló oldat:

<i>Witche's Brew</i>	140 µl
PFA (4%)	250 µl
Metanol (90%)-EDTA (10%)	250 µl

PBS oldat (10X) (200 ml-re):

NaCl	16 g
KCl	0,4 g
Na ₂ HPO ₄	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g

Tris-Triton puffer:

Tris-HCl (ph 7,4)	5 ml
-------------------	------

Triton X-100	500 µl
EDTA	100 µl
Witche's Brew (2X):	
NaCl	400 µl
KCl	8 ml
Na ₂ EGTA	5 ml
Spermidin-HCl	5 ml
Na-PIPES (ph 7,4)	1,5 ml
Metanol	25 ml
PBST-B puffer:	
PBS puffer	1 %
BSA	0,1 %
Triton-X	0,1 %
Nátrium- azid	5 mM
EDTA	1 mM

4.12. Antitestfestés egész állaton

- az állatokat lemosása M9 oldattal falcon csőbe
- centrifuga: 1500 rpm, 1 perc
- mosás háromszori ismétlése
- negyedik mosás deszt. vízzel
- centrifuga: 1500 rpm, 1 perc
- felülúszó eltávolítása, a végtérfogat 900 µl
- inkubálás jégen 5 percig
- 1 ml jéghideg 2X RFB puffer hozzáadása
- 110 µl 36,5%-os formaldehid hozzáadása, összekeverés
- csövek lefagyasztása folyékony nitrogénben
- kiolvasztás folyó csapvíz alatt
- inkubálás víz-jég fürdőben 3,5 órán át, 30 percenként megkeverés
- centrifuga: 1400 rpm, 1 perc, 2°C
- kétszer mosás 2 ml TTE pufferrel
- 2 ml TTE-mercaptoetanol keverék hozzáadása
- inkubálás 4 órán át 37°C-on, 30 percenként keverés
- centrifuga: 1400 rpm, 1 perc, 2°C

- átmosás 2 ml borát pufferrel
- centrifuga: 1400 rpm, 1 perc, 2°C
- 2 ml borát, 10 mM DTT oldat hozzáadása
- inkubálás 15 percig 37°C-os vízfürdőben
- centrifuga: 1400 rpm, 1 perc, 2°C
- átmosás 2 ml borát pufferrel
- 2 ml borát- H₂O₂ oldat hozzáadása
- centrifuga: 1400 rpm, 1 perc, 2°C
- átmosás 2 ml borát pufferrel
- felülúszó eltávolítása
- 3 ml PTC oldat hozzáadása
- finom rázatás mellett inkubálás szobahőmérsékleten 30 percig
- centrifuga: 1400 rpm, 1 perc, 2°C
- felülúszó eltávolítása
- 2 ml PTB oldat hozzáadása
- 40 µl-ként szétosztás falcon csövekbe
- 160 µl PTB oldat hozzáadása
- az elsődleges antitestet hozzáadása 1:100 hígításban
- inkubálás egész éjszakán át lassú rázatás mellett 4°C-on
- háromszor átmosás 1 ml PTC oldattal
- átmosás 1 ml PTB oldattal
- mosási lépések között inkubálás 1-1 órán át lassú rázatás mellett szoba hőmérsékleten
- 40 µl-ként szétosztás falcon csövekbe és 160 µl PTB oldat hozzáadása
- a másodlagos ellenanyag hozzáadása 1:50 hígításban
- inkubálás egész éjszakán át lassú rázatás mellett 4°C-on
- ötször átmosás 1 ml PTC oldattal
- mosások között 1-1 óra inkubáció szoba hőmérsékleten lassú rázatás mellett
- DAPI oldat hozzáadása
- eredmények fénymikroszkóppal történő kiértékelése

4.13. Antitestfestés embriókra

- az állatok lemosása a lemezről deszt. vízzel
- a felülúszó eltávolítása
- 5 ml bleach oldat hozzáadása

- inkubálás 10 percig szobahőmérsékleten (az állatok széteséséig)
- centrifuga: 13000 rpm, 2 perc
- háromszor mosás deszt vízzel
- 610 µl deszt víz hozzáadása
- 1,5 ml fixáló oldat hozzáadása
- inkubálás jégen 20 percig
- csövek lefagyasztása folyékony nitrogénben
- kiolvasztás folyó csapvíz alatt
- inkubálás szoba hőmérsékleten 20 percig lassú forgatás mellett
- centrifuga: 1500 rpm, 1 perc
- mosás 1 ml Triton- Tris pufferrel
- mosás 1 ml PBST-B oldattal
- inkubálás 1 ml PBST-B oldatban 15 percig lassú forgatás mellett szobahőmérsékleten
- 300 µl-ként szétosztás eppendorf csövekbe
- centrifuga: 1500 rpm, 1 perc
- felülúszó eltávolítása
- az elsődleges ellenanyag hozzáadása
- inkubálás egész éjszakán át szobahőmérsékleten lassú rázatás mellett
- centrifuga: 1500 rpm, 30 sec
- négyszer mosás 25 percig 1ml PBST-B oldattal
- centrifuga: 1500 rpm, 1 perc
- felülúszó eltávolítása
- a másodlagos ellenanyag hozzáadása
- inkubálás 2,5 órán át szoba hőmérsékleten
- mosás négyszer 1 ml PBST-B oldattal
- centrifugáljuk: 1500 rpm, 1 perc
- a felülúszó eltávolítása
- DAPI oldat hozzáadása
- szétosztás lyukacsos tárgylemezre: lyukanként 6-6 µl
- Vecta shield oldat hozzáadása
- lefedés fedőlemezzel
- eredmények fénymikroszkóppal történő kiértékelése

Bleach oldat:

NaOH

1 ml

NaHCl	1 ml
Deszt víz	8 ml

A többi használt oldat összetétele megtalálható a TUNEL festés leírásánál.

4.14. lacZ festés egész állatra és embrióra

- minta inkubálása 2 órán át 30°C-on,
- inkubálás szobahőmérsékleten 1 órán át
- férgek lemosása a lemezről
- 25 µl deszt. víz hozzáadása
- fagyasztás -70°C-on 30 percig
- víz eltávolítása vákuum szivattyúval
- 100 µl aceton (-20°C-os) hozzáadása
- inkubálás szoba hőmérsékleten 5 percig
- 50 µl festő oldat hozzáadása
- az állatok szátoztatása 6-6 µl-ként
- inkubálás egy éjszakán át 37°C-on
- eredmények fénymikroszkóppal történő kiértékelése

A festő oldat összetétele (500 µl-re):

NaPO ₄ (ph 7)	125 µl
MgCl ₂	5 µl
SDS	2 µl
Fe stock (100mM)	25 µl
X-gal (2%)	6 µl
Deszt víz	337 µl

4.15. EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

A teljes hosszúságú, rekombináns ATF-2 és CES-2 fehérjéket hisztamin affinitás kromatografiával tisztítottuk. A fehérjék és az *lgg-1* és *bec-1* gének promóter régiójában újonnan azonosított potenciális CES-2 szabályozó elemek közötti kölcsönhatást TBE-PAGE 8% natív gélen vizsgáltuk etidium- bromidos festést alkalmazva. CES-2 fehérjét 5 µM, ATF-2 fehérjét 10 µM, az oligonukleotidokat, pedig 1 µM végkoncentrációban használtuk minden reakcióban. A fehérje- oligonukleotid keverékeket 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk mielőtt felvittük őket a gélre.

5. EREDMÉNYEK

Alapvető célunk az autofágia szerepének vizsgálata volt a különböző sejthalál folyamatokban *C. elegans*ban. A dUTPáz inaktiválása által indukált sejthalál modellt kívántuk elsődlegesen használni az autofágia sejtpusztulásban betöltött szerepének tisztázásához. Ehhez elsőként a dUTPáz kódoló *dut-1* gén jellemzését végeztük el.

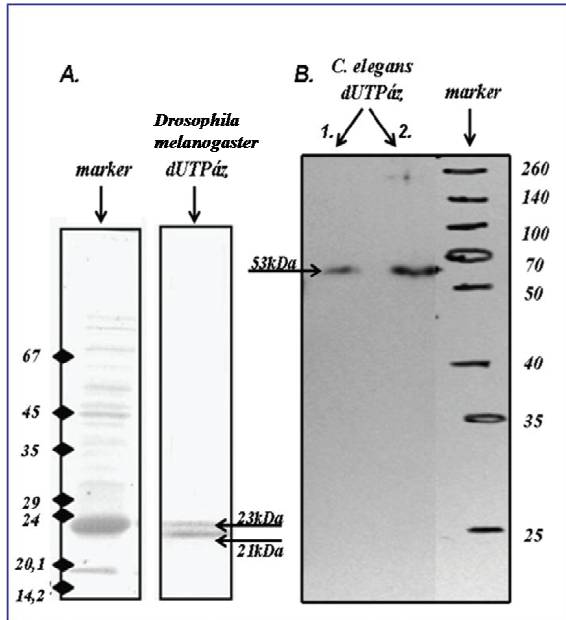
5.1. A *C. elegans* dUTPáz kódoló *dut-1* gén jellemzése

5.1.1. A *C. elegans* dUTPáz fehérje

Drosophilában és emlősökben a dUTPáz fehérjének két izoformája létezik: egyik a sejtmagban található (DUT-N), a másik pedig a mitokondriumban (DUT-M). Mindkét sejtsszervecskének saját DNS-e és replikációs mechanizmusa van (Koehler és Ladner, 2004). A dUTPáz változatok expressziós mintázata a sejtmagi és a mitokondriális genomok DNS replikációs mintázatát tükrözi. A DUT-N expressziója az S fázis-specifikus génekhez kötődik. A DUT-M izoforma konstitutív módon szabályozódik a mitokondriális replikációt követve. Köztudott, hogy az itt folyó nukleotid szintézis a sejtcentrikus replikációtól függetlenül folyamatosan zajlik. A dUTPáz két különböző izoformáját ugyanaz a gén kódolja. Mindkét izoforma a sejtmagi génről szintetizálódik 5' alternatív exonokat felhasználva (Studebaecker és mtsi., 2005). A DUT-N izoforma in vivo állapotban foszforilált, a sejtmagi forma nukleotid lokalizációs szignált hordoz, ezért valamivel hosszabb.

A *C. elegans* dUTPáz fehérjét izoláltuk és szeparáló gélen futattuk meg, majd *Drosophila* dUTPáz antiszérummal detektáltuk (**17. ábra**). Az irodalmi adatokkal ellentétben, csak egyetlen trimer molekulatömegű fehérjét azonosítottunk a gélen. Ez a nagyobb izoforma a sejtmagi változatot jelenti. A mitokondriális izoforma hiányára kétféle lehetséges magyarázatot adhatók: 1, a rövid izoforma annyira labilis, hogy nem lehet detektálni; 2, vagy annyira kis mennyiségben van jelen, hogy az alkalmazott technikával nem tudtuk láthatóvá tenni.

A gélképen látható *C. elegans* dUTPáz fehérje *Drosophila* antiszérummal történő detektálása azt mutatja, hogy a két faj dUTPáz ortológjai nagymértékű szekvenciális hasonlóságot mutatnak. A fehérje tehát evolúciósan nagymértékben konzervált.



17. Ábra. A *C. elegans* dUTPáz Western-blot analízise. A, A második oszlopban a *Drosophilából* származó rekombináns fehérje képe, amelyen jól látható a két izoforma (nyilak). B, A második és harmadik oszlopban a főregből származó mintákban hiányzik a nagyobb izoforma. *Drosophila* dUTPáz specifikus antitesttel történt jelölés.

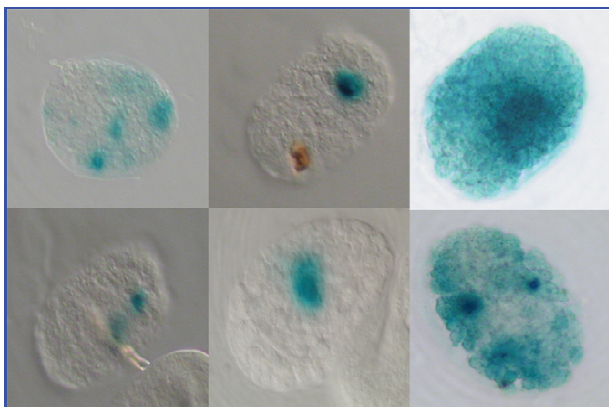
5.1.2. A *C. elegans* dUTPáz expressziós vizsgálata

A dUTPáz enzim tér-időbeli (egyedfejlődési) expressziós mintázata informatív a fehérje funkcióját illetően. Humán rákos sejtekben a dUTPáz mennyisége és intracelluláris lokalizációja extrém módon változik (Fotoohi és Albertioni, 2008). Az enzim aktivitása a citoplazmában és a sejtmagban egyaránt magas, míg a normális sejtekben csak nagyon alacsony génaktivitást mutatható ki. A sejtmagi festődés a replikálódó sejtekben figyelhető meg, és olyan szövetekben, amelyek sok mitokondriumot tartalmaznak. A tumoros sejtekben tapasztalt dUTPáz expressziót három nagy csoportba lehet osztani: extrém sejtmagi, extrém citoplazmás és a kettő kombinációja. A dUTPáz expressziója fejlődéstanilag szabályozott a magasabbrendű élőlényekben. A legnagyobb aktivitást a még nem differenciálódott, proliferálódó sejtek mutatják.

5.1.2.1. A dUTPáz egyedfejlődési mintázata *C. elegans*ban

Dr. Ian Hope angol kutató leedsi laboratóriumából kaptunk két törzset, amelyek az UL993 és UL994 plazmidokra transzgenikusak. A konstrukciók nem integráltak, a transzgenikus állatok kiszűrésének megkönnyítésére egy roller fenotípust eredményező ko-transzformációs markert is elhelyeztek a plazmidokon. Ezekben az állatokban a *dut-1* gén (*K07A1.2* ORF) egy *lacZ* riporter génnel van fúzionáltatva, így megfelelő β -galaktozidáz jelöléssel vizsgálható a gén expressziós mintázata. Kísérleteink szerint a dUTPáz az úgynevezett *pre-comma* állapotú embriókban és felnőtt állatokban is megfigyelhető (18. ábra).

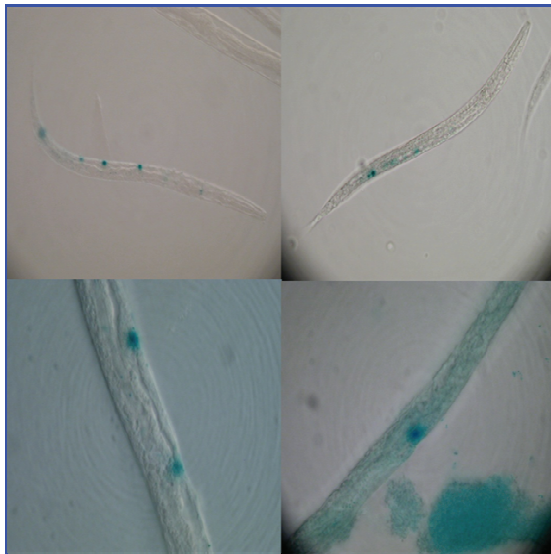
Egy festés alkalmával 15-20 jó kondícióban lévő, fertőzésmentes lemezt használtam, ami megközelítőleg kétezer állatot jelentett, ha lemezenként száz felnőtt egyeddel számolunk. Negatív kontrollként vad típusú állatokat (N2) használtam az esetleges aspecifikus festődések kiszűrésére. Ezekben az egyedekben semmiféle festődés nem volt detektálható (nem mutatott adatok).



18. Ábra. A dUTPáz kódoló *dut-1* gén expressziója csak néhány szomatikus sejtben detektálható *C. elegans* embriókban. Egy *dut-1::lacZ* riporter génkonstrukciót hordozó különböző korú transzgenikus embriók expressziós mintázata β -galaktozidáz festés után. A *dut-1* gén aktivitását kék elszíneződést mutatja. A kontroll (nem transzgenikus) állatokban nem tudtunk detektálni *dut-1* aktivitást.

A dUTPáz enzim biológiai funkciójának ismeretében arra számítottunk, hogy az állatok minden sejtjében megfigyelhető lesz a génaktivitás. Korábbi eredményeink alapján

kiderült, hogy *C. elegans*ban csak egy dUTPáz izoforma létezik, és ez minden replikálódó sejtben (mint amilyenek az intenzíven osztódó embrionális sejtek) aktív.



19. Ábra. *dut-1::lacZ* riporter gént hordozó transzgénikus állatok expressziós mintázata. A génaktivitást a β -galaktozidáz festés detektálja (kékkel jelölt sejtek). Felnőtt állatokban a vulvaszövet környékén festődik néhány sejt. Néhány állatban a test más pontjain is detektálható volt festődés. A kontroll (nem transzgénikus) állatokban kékre színeződött sejt nem volt megfigyelhető.

Az eredmények azonban nem ezt igazolták. Az állatokban mindössze átlagosan egy vagy két sejtben lehetett megfigyelni a kék színnel jelzett génaktivitást. E jelenségre két magyarázatot találtunk: 1, festési módszerünk valószínűleg nem elég érzékeny és a nem pozitív sejtekben az enzim aktivitása nem éri el a detektálható szintet; 2, vagy a rögzítés pillanatában csak ebben a néhány sejtben folyt DNS szintézis. A második feltevés igen valószínűtlen az embriók esetében. Következtetésként levonhatjuk, hogy az enzim aktivitása a sejtciklus egy bizonyos szakaszában detektálható szintű maximumot ér el, a többi fázisban viszont csak alapaktivitást mutat, amely annyira alacsony, hogy a *lacZ* riporter génkonstrukció alkalmatlan a kimutatására.

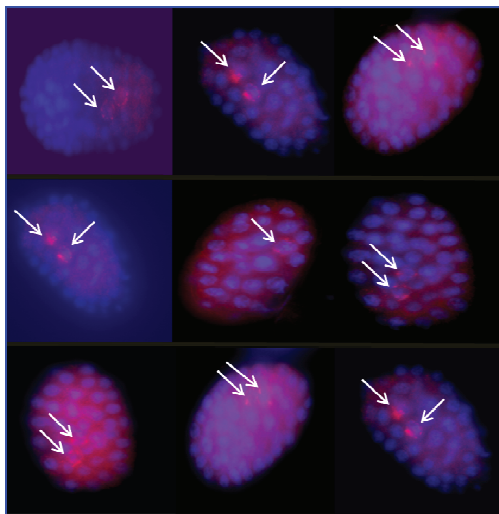
A kísérletet megismételtem felnőtt állatokkal is. Ezekben szintén csak néhány sejtben láttam festődést a vulvaszövet környékén (19. ábra).

5.1.2.2. A *C. elegans* dUTPáz fehérje lokalizációja

Egy fehérje intracelluláris és szöveti lokalizációjának kimutatására az antitestfestés az egyik legmegfelelőbb technika. Az antitestfestés során a fehérje ellen specifikus ellenanyagot termeltetünk, majd az ellenanyagot tesszük láthatóvá másodlagos ellenanyagok segítségével. Az Enzimológiai Intézet dUTPáz csoportjától kaptunk egy humán dUTPázra tervezett monoklonális ellenanyagot. A festés során az ún. *pre-comma* állapotú embriókban vizsgáltuk a fehérje akkumulációját. Kontrollként az aspecifikus festődés kizárására dUTPáz RNS interferenciával kezelt vad típusú állatokat használtam, amelyekben a fehérje szintje jelentős mértékben csökkentett volt.

A kapott eredmények egybevágtak a lacZ festés során tapasztaltakkal. Csak egy-két sejtben volt megfigyelhető dUTPáz fehérje akkumuláció (**20. ábra**). Az enzim intracellulárisan perifériás lokalizációt mutatott.

Korábbi kísérleteim során kimutattam, hogy *C. elegans*ban a dUTPáz enzimnek csak egy (sejtmagi) izoformája van jelen. A perifériás lokalizáció azzal magyarázható, hogy normális körülmények között a fehérje nagyobb mennyiségben a citoplazmában található, és csak stressz-körülmények között transzportálódik a sejtmagba, feltehetően a sejtmagi lokalizációs jel segítségével. Elképzelhető, hogy a dUTPáz fehérje a sejtmagban csak alacsony (bazális) mennyiségben fordul elő, ami sem lacZ riporter génkonstrukcióval, sem antitestfestéssel nem mutatható ki.

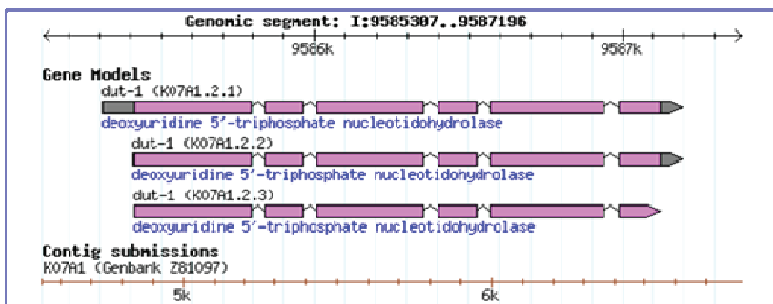


20. Ábra. A dUTPáz fehérje akkumulációja *C. elegans* embriókban. A piros szín a humán dUTPáz-specifikus antitest festődést, a kék jel a sejtmagi DAPI festést jelöli. Pre-comma állapotú embriókban hány sejt mutat citoplazmás dUTPáz akkumulációt (piros sejtek, nyíllal jelölve).

5.1.3. A dUTPáz inaktíválása embrionális életképtelenséget okoz *C. elegans*-ban

Különböző emlős modellszervezetek és *Drosophila melanogaster*en végzett vizsgálatok alapján tudjuk, hogy a dUTPáz enzim a dUTP hidrolízisét katalizálja (Ladner 2001). Az így keletkező dUMP a *de novo* dTMP szintézis szubsztrátja. dUTPase enzim hiányában a sejt dUTP/dTTP arány felborul, és ennek következtében az újonnan szintetizálódó DNS láncba uracil kerül timin helyett (Vértessy és Tóth, 2009). Az így keletkezett hibákat a sejt DNS-javító mechanizmusa egy bizonyos határ felett nem képes helyreállítani, ami genotoxikus stressz indukálta sejthalálhoz vezethet.

A dUTPáz *C. elegans* ortológját kódoló *dut-1* gén (**21. ábra**) funkcionális vizsgálatát reverz genetikai eszközökkel végeztem el. A *dut-1* gén esetében nincs elérhető mutáns törzs, ezért a gént RNS interferenciával csendesítettem. Az RNS interferencia konstrukciót magam készítettem el az anyag és módszer fejezetben leírtak alapján. A duplaszálú RNS-t az ún. etetéses (*feeding*) módszerrel jutattam a különböző fejlődési stádiumban lévő állatokba, majd vizsgáltam a géncsendesítés egyedfejlődésre gyakorolt hatását.



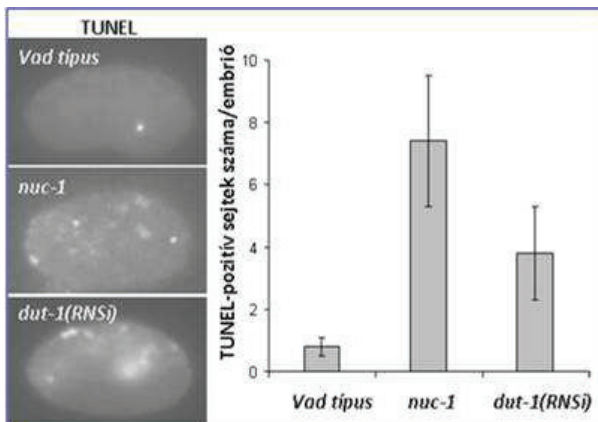
21. Ábra. A *C. elegans* dUTPáz kódoló *dut-1* gén (K07A1.2 ORF) szerkezete a Wormbase adatbázis szerint. Felül a genomi pozíció, alul a megfelelő cosmid klón fragmentuma látható. A lila boxok exoni, az őket összekötő fekete vonalak introni szekvenciákat jelölnek. Az adatbázis 3 alternatív izoformát prediktál.

Ha L3 vagy korábbi lárváállapotban kezdtem meg a *dut-1* RNS interferencia kezelést, akkor a géncsendesítés hatására alacsony penetranciájú lárvális letalitást figyeltem meg (22. ábra). A felnőtt kort elérő hermafrodita állatok (F1 generáció) sterilek voltak és kitüremkedő páرزószervvel (Pvl; *protruded vulva*) rendelkeztek (22. ábra). Ha L4 lárváállapotban kezdtem meg az RNSi kezelést, akkor a hermafrodita állatok elérték a felnőtt kort, ám utódaik embrióként elpusztultak (F2 generáció). A felnőtt állatok között alacsony penetranciával kitüremkedő (Pvl) páرزószervvel rendelkező állatokat is megfigyeltem (a megvizsgált 1000 állat, kb. 20%-nál). A rendellenes vulva struktúrájú állatok nem tudták lerakni az embriókat, így azok a hermafrodita „mama” testében pusztultak el (22. ábra).

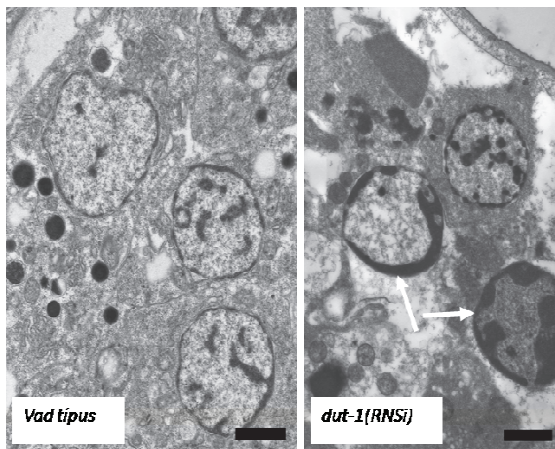


22. Ábra. A dUTPáz kódoló *dut-1* gén csendesítése morfológiai rendellenességeket okoz. A bal oldali panelen egy *dut-1(RNSi)* L1 lárva látható. Az állat anterior részén súlyos morfogenetikai defektusok figyelhetők meg. A jobb oldali képen egy *dut-1(RNSi)* hermafrodita látható kitüremkedő vulva struktúrával (fehér nyíl). A fekete vonalak 20µm-t jelölnek.

Az elpusztult *dut-1(RNSi)* embriókban nagy mennyiségű apoptotikus sejtestet azonosítottunk fénymikroszkóppal (**23. ábra**) és transzmissziós elektronmikroszkóppal (**24. ábra**). A fénymikroszkópos vizsgálatok során egyrészt közvetlenül vizsgáltam az apoptotikus sejtek számát DIC optikával, másrészt TUNEL jelölést végeztem, amely specifikusan jelöli a szabad DNS végeket a pusztuló sejtekben. Mindkét módszer az apoptózissal pusztuló sejtek számának moderált növekedését mutatta a fejlődésben megrekedt *dut-1(RNAi)* embriókban. Ezekben az embriókban sejtosztódási rendellenességeket is megfigyeltem. A sejtciklus lelassult, és több magvú sejtek jöttek létre. A megfigyelt fenokópiák magyarázhatók a dUTPáz hiányával, hiszen a genotoxikus stressz a sejtciklus lelassulásához ill. leállításához vezet, majd a sejtek apoptózissal elpusztulnak (Hengartner, 2000).



23. Ábra. A *dut-1* gén csendesítése RNS interferenciával megnöveli az apoptózissal elpusztuló sejtek számát az embriogenezis során. Bal oldalon TUNEL jelölés vad típusú (kontroll), *nuc-1* mutáns (pozitív kontroll) és *dut-1(RNSi)* embriókban. Jobb oldalon a pusztuló sejtek kvantifikálása látható. Minden genotípus esetén 40-40 embriót vizsgáltunk meg. Az oszlopok látható talpas vonalak a S.E.M.-et mutatják. A különbségek minden esetben statisztikailag szignifikánsak ($p < 0.0001$, párosítatlan t-test).



24. Ábra. Apoptotikus sejtek *dut-1(RNSi)* embriókban. A, Egy vad típusú embrióról készült metszet. B, Egy *dut-1(RNSi)* embrióról készült metszet. A nyílak kondenzált kromatin tartalmú sejteket mutatnak. Transzmissziós elektronmikroszkópos képek.

Az apoptotikus sejt citoplazmája és membránjai összezsugorodnak, DNS-e letekeredik, a sejtmag fragmentálódik, az endoplazmatikus retikulumról leválnak a riboszómák, lizoszómális enzimek szabadulnak ki a citoszólba; mindezek eredményeként a haldokló sejt részeit tartalmazó apoptotikus testek jönnek létre. A pusztuló sejt maradékát egy szomszédos sejt fagocitálja, végleges lebontása ebben megy végbe. Az apoptotikus pusztuló sejt kimutatására két módszer létezik: fénymikroszkóposan az apoptotikus testek számolása és különböző hisztokémia festések általi detektálása. A szakirodalomban a legáltalánosabban elfogadott a TUNEL festési (terminális deoxinukleotidil transzferáz közvetítette hasítási (nick) végjelölés) eljárás. Ez a technika a terminális deoxinukleotidil transzferáz (TdT) enzimet használja a DNS 3' hidroxí végeinek jelölésére, és később ezek a módosított nukleotidok fluoreszcens vagy immun hisztokémiás módszerekkel detektálhatóak. A TUNEL festés specifikusan a haldokló sejteket jelöli, mert a DNS degradáció következményeként ezekben a sejtekben sokkal több a szabad 3' hidroxí DNS vég, mint a normális sejtekben.

2. Táblázat. Apoptotikus sejttestek száma *dut-1(RNSi)* embriókban.

Genotípus	TUNEL festés	Nomarski optikával
vad típus	0,075	2,65
<i>nuc-1(e1392)</i>	7,42	11,4
<i>dut-1(RNS)</i>	8,85	12,6

Minden genotípus esetében 40 darab *pre-comma* állapotú embrióval dolgoztam. A vad típus negatív kontrollként, a *nuc-1* mutáns állatok pozitív kontrollként szolgáltak.

Az RNS interferencia kísérletek során kontrollként olyan baktérium törzssel ettettem az állatokat, amely csak az üres RNSi vektort hordozta. Mivel a kontroll kísérletekben egyik lárvastádiumban sem figyeltem meg rendellenességet, kijelenthető, hogy az RNSi konstrukció volt a felelős a morfológiai eltérésekért.

Annak bizonyítására, hogy az RNS interferencia konstrukció valóban a *dut-1* génre fejt ki a hatását, a timidin szintézis előanyagát (dUMP) juttattuk *dut-1(RNSi)* állatokba. A dUMP-t különböző koncentrációban kevertük az agarba (1μM, 10μM, 100μM), ami a táplálékként szolgáló baktériumokon keresztül juthatott az állatok szervezetébe. A kísérlet során azt vizsgáltuk, hogy a dUMP kezelés hatással van-e a *dut-1(RNSi)* embriók életképességére. Eredményeink szerint már az 1μM koncentrációban használt exogén dUMP kezelés szignifikánsan csökkentette az elpusztult embriók százalékos arányát a kontrollhoz képest (**3. táblázat**). Ez arra utal, hogy a *dut-1(RNSi)* embriók életképtelensége valóban a *dut-1* gén csendesítésének következtében jön létre. A megfigyelt fenokópiák (sterilitás,

embrionális életképtelenség, embrionális sejtek megnövekedett mértékű apoptózisa) mindegyike magyarázható a dUTPáz hiányával, ezért kijelenthető, hogy a *dut-1* gén funkcionális dUTPáz kódol.

3. Táblázat. A táptalajhoz adott dUMP bizonyos mértékben csökkentette az elpusztult embriók számát a kontrollhoz képest.

	steril peték száma	felnőtt állatok száma
N2 (<i>dut-1</i>)RNSi	23	5
N2 (<i>dut-1</i>)RNSi +1 μ M dUMP	3	54
N2 (<i>dut-1</i>)RNSi +10 μ M dUMP	10	12
N2 (<i>dut-1</i>)RNSi +100 μ M dUMP	30	2

Az üres vektorral etetett kontroll lemezeket nem ábrázoltuk, ott nem voltak steril peték, csak normálisan szaporodó állatok.

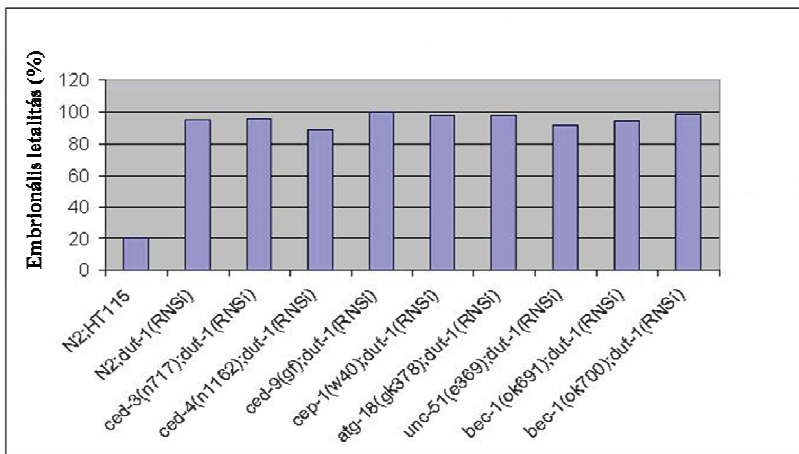
Munkám közben egy másik kutatócsoport is készített egy *dut-1* RNSi konstrukciót, és ennek fenokópia hatása a mi eredményeinkkel összevethető volt (Dengg et al, 2007). A Hilde Nilsen csoportja által készített *dut-1* RNSi konstrukciót megkaptuk, és mi is felhasználtuk a kísérletekhez.

5.1.4. Az apoptózis és autofág gének funkcióvesztéses mutációi nem, az autofágia gén *lgg-1/Atg8* funkcionális kópiája részlegesen szuppresszálja a *dut-1* gén inaktiválása által okozott embrionális és lárvális életképtelenséget

Az irodalomban nem volt adat arról (2007-ben), hogy a dUTPáz milyen jelátviteli útvonalakkal, molekuláris mechanizmusokkal áll kapcsolatban. Mivel az enzimet kódoló *dut-1* gén inaktiválása embrionális életképtelenséget okoz *C. elegans*-ban, feltételeztük az enzim genetikai kapcsolatát az apoptózis (I-es típusú programozott sejthalál) és autofágia (II-es típusú programozott sejthalál) rendszerekkel.

Ennek a feltételezésnek a vizsgálatához a *dut-1* gént csendesítettük apoptózis és autofágia mutáns genetikai hátterekben, és vizsgáltuk az utódok életképességét. Kontrollként *dut-1(RNSi)* állatokat vizsgáltunk, amelyek majdnem teljes penetranciájú embrionális életképtelenséget mutattak (25. ábra). Az apoptózis folyamatának kulcsfaktorai *C. elegans*-ban a *ced-3*, *ced-4* és *ced-9* gének. A *ced-3(n717)*, *ced-4(n1162)* és *ced-9(n1950gf)* apoptózis deficienciát okozó mutációk *dut-1(RNSi)* genetikai háttérben nem változtatták meg (szuppresszálták) szignifikáns mértékben az állatok embrió letális fenotípusát. Ez azért volt

érdekes, mert azt feltételezték, hogy a dUTPáz gén inaktiválása genotoxikus stressz-válaszhoz vezet, és ezen keresztül programozott sejthalált iniciál a károsodott sejtek eltávolításához. Az apoptózis blokkolása azonban nem szuppresszálta a *dut-1(RNSi)* embriók pusztulását.



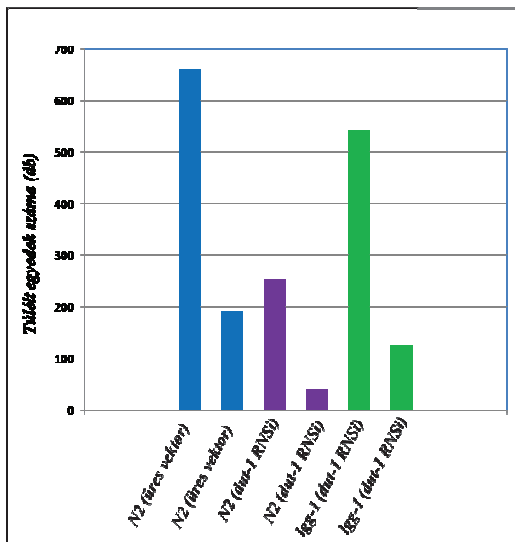
25. Ábra. Apoptózis és autofágia specifikus gének funkcióvesztéses mutációi nem szuppresszálják a *dut-1(RNSi)* embriók letalitását. A *dut-1* gén csendesítése embrionális életképtelenséget okoz. Az apoptózis és az autofágia útvonalak nem befolyásolják a *dut-1(RNSi)* embriók életképességét. Apoptózis defektív mutációk: *ced-3(n717)*, *ced-4(n1162)*, *ced-9(n1950gf)* és *cep-1(w40)*; autofágia deficiens mutációk: *atg-18(gk378)*, *unc-51(e369)*, *bec-1(-)*.

A sejtek genotoxikus stresszre adott válaszában egyik kulcsfehérje a tumorszuppresszor p53, amelynek *C. elegans* ortológja a CEP-1 (Derry és mtsi., 2001). *cep-1(gk138)* mutáns állatok életképesek. Ezeket az állatokat *dut-1 RNSi*-vel kezelve szintén nem tapasztaltunk változást a *dut-1(RNSi)* állatokhoz képest.

Az autofág génkaskád konzervált komponenseinek mutációs inaktiválása dUTPáz deficiens genetikai háttérben az előzőekhez hasonlóan nem eredményezett életképesség javulást (25. ábra). Az *atg-18*, *unc-51/Atg1* és *bec-1/Atg6* autofág gének funkcióvesztéses mutációi *dut-1(RNSi)* embriókban nem szuppresszálta azok letalitását. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a vizsgált autofág gének inaktiválása nem befolyásolja a *dut-1* csendesítése által okozott életképtelenséget. A jelenség magyarázataként elképzelhető, hogy az apoptózis és az autofágia parallel (redundáns) módon szabályozzák a genotoxikus stressznek kitett sejtek eltávolítását; az egyik útvonal hiányában a másik útvonal még funkcionális. Ezt a lehetőséget potenciálisan apoptózis-autofágia deficiens kettős mutáns

törzsek vizsgálatával lehet megválaszolni. Az erre vonatkozó eredményeinket Erdélyi Péter Ph.D. hallgató kollegám készülő doktori dolgozata tartalmazza. Alternatívaként elképzelhető az is, hogy egy másik (pl. nekrotikus) sejthalálforma távolítja el a károsodott sejteket, ami végül az embrió pusztulását eredményezi.

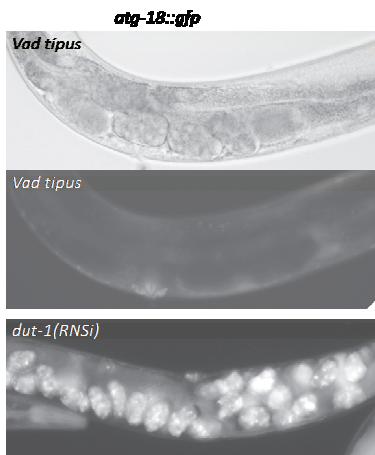
Rendelkeztünk egy olyan törzzsel is, amely az *lgg-1/Atg8* autofágia gén egy funkcionális (transzlációs fúziós) transzgén kópiáját tartalmazta (*p_{lgg-1}::GFP::LGG-1* genotípus). Ez felfogható *lgg-1* funkciónyeréses mutáns törzsnak. Ezt a törzset *dut-1* duplaszállú RNS-sel kezelve azt tapasztaltuk, hogy szignifikánsan csökkent az embrió pusztulása, összehasonlítva a *dut-1(RNSi)* állatokkal (26. ábra).



26. Ábra. *lgg-1* funkciónyeréses autofág mutáns törzs szuppresszálja a *dut-1* embrió letális fenikópiát. Az első két oszlop N2 vad típusú állatok túlélését mutatja. Az első kék oszlop az életképes peték számát, a második pedig a túlélő felnőtteket ábrázolja. Ők a kontroll csoport, üres vektossal etettem őket. A lila oszlopok a *dut-1* RNSi-val kezelt N2 állatok túlélését mutatják. Az első oszlop az életképes petéket, második pedig a túlélő felnőtteket ábrázolja. A zöld oszlopok *lgg-1* törzs túlélését mutatják *dut-1* RNSi kezelés után. Az első oszlop a túlélő petéket, a második pedig az életben maradt felnőtt állatok számát mutatja. Jól látható, hogy a kontroll állatokhoz képest *lgg-1* funkciónyeréses mutáns törzs jobb túlélési adatokat mutat.

5.1.5. A *dut-1* inaktíválása fokozza az autofágia gének embrionális expresszióját

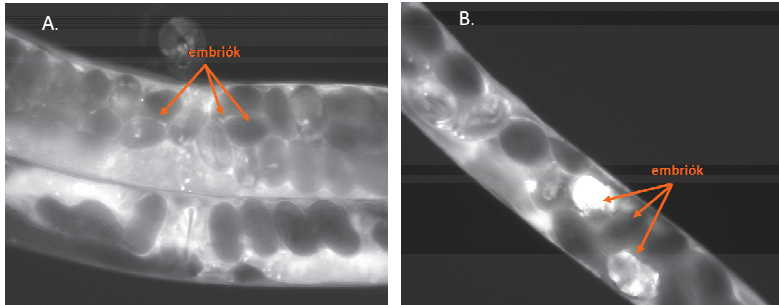
Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy vajon fokozódik-e az autofágia aktivitása *dut-1(RNSi)* embriókban, a *bec-1*, *lgg-1* és *atg-18* autofágia gének embrionális expressziós analízisét végeztem el *gfp* riporter génkonstrukciók segítségével vad típusú és *dut-1(RNSi)* genetikai háttérben. Az *atg-18* gén expresszióját az *sIs13209* integrált transzgént hordozó törzs (BC12515) segítségével vizsgáltam. Ez a konstrukció az *atg-18* gén egy transzkripciósi fúziós riporter rendszerét tartalmazza. Kezeletlen állatok embrióiban az *atg-18::gfp* kismértékű (alacsony expressziós szint), a citoplazmában diffúzan expresszálódó mintázatot mutatott (27. ábra). Ezzel szemben *dut-1(RNSi)* embriókban az *atg-18* igen intenzíven, a citoplazmában nagy granulumokban felhalmozódva expresszálódott.



27. Ábra. Az *atg-18* autofágia gén expressziója jelentős mértékben megnő dUTPáz deficiens embriókban. Felső panel: egy *atg-18::gfp* konstrukcióra transzgénikus hermafrodita állat Nomarski optikával készült képe. Középső panel: a felső panelen látható állatról készült fluoreszcens kép. Az állatban látható embriókban ezen a nagyításon nem látható számottevő GFP jel. Alsó panel: egy *atg-18::gfp* konstrukcióra transzgénikus, *dut-1* RNSi-vel kezelt hermafrodita állatról készült fluoreszcens fotó. Az állatban lévő embriók intenzív *atg-18* expressziót mutatnak (fehér golyók).

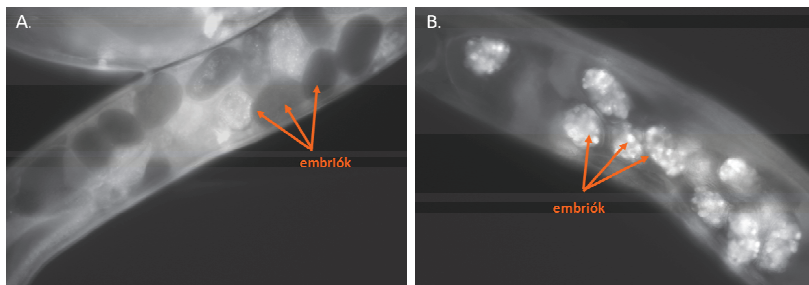
A *bec-1* gén expresszióját az FR758 *swEx520* [*pbec-1::BEC-1::GFP+ rol-6(su1006)*] transzgenikus törzs segítségével vizsgáltam. Vad típusú háttérben a *BEC-1::GFP* csekély mértékű embrionális expressziója figyelhető meg, míg *dut-1(RNSi)* kezelés hatására az embriók egy részében az expresszió nagyon erőteljessé és granulárisá vált (28. ábra). Az

FR758-as törzs a *BEC-1::GFP*-t kódoló szakaszt nem a genomba integrálva, hanem extrakromoszómálisan hordozza. Ez magyarázhatja azt, hogy miért csak az embriók egy részében volt megfigyelhető intenzív *BEC-1::GFP* expresszió, némelyik embrió pedig nem mutatott GFP aktivitást.



28. Ábra A *bec-1* autofágia gén expressziója jelentősen megnövekszik *dut-1* inaktiválás hatására. **A**, Vad típusú genetikai háttérben az embriók csekély mértékű *bec-1* expressziót mutatnak (fekete gömbök a hermafrodita ivarszervében, nyilak). **B**, *dut-1* duplaszálú RNS-sel kezelt *BEC_1::GFP* transzgenikus állatokban igen intenzív és granuláris expresszió figyelhető meg egyes embrióban. A konstrukció extrakromoszómálisan öröklődik (nem integrált), ez magyarázhatja, hogy miért csak az embriók egy részében (nyilak) látható intenzív expresszió.

Az *lgg-1* gén expresszióját a [*p/agg-1::LGG-1::GFP* + *rol-6(su1006)*] genotípusú buEx070 törzs használatával elemeztem. A vad típusú háttérben tapasztalható embrionális *GFP::LGG-1* expresszióra jellemző, hogy dinamikusan változik. Az expresszió a 4E sejtés állapotban jelentkezik először. *GFP::LGG-1* transzgenikus állatokban a *dut-1* gén RNS-i-közvetített inaktiválása igen erős, granuláris GFP expressziót eredményezett az embriókban (29. ábra).



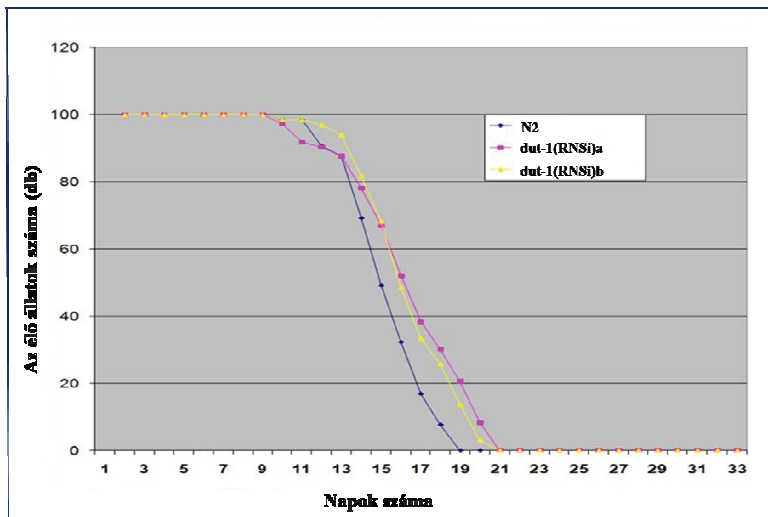
29. Ábra A GFP::LGG-1 embrionális expresszió meghatározása vad típusú és *dut-1(RNSi)* háttérben. A, Vad típusú genetikai háttérben az embriók nem, vagy csak igen kis mértékben világítanak, bennük alig figyelhető meg granuláris GFP::LGG-1 expresszió (nyilak). **B,** *dut-1* RNSi-kezelt GFP::LGG-1 transzgenikus állatokban igen intenzív és granuláris jelelődés figyelhető meg minden embrióban (nyilak). A hermafrodita állat („mama”) testfalában lévő háttér expresszió diffúz halvány foltként jelenik meg.

Az eredmények alapján elmondható, hogy az autofágia gének expressziós aktivitása jelentős mértékben megnő genotoxikus stressznek kitett (dUTPáz inaktivált) embrionális sejtekben. Ez azt sugallja, hogy az autofágia rendszer közreműködik a stressz-indukált sejtpusztulási folyamatokban; vagy az apoptózissal parallel hatva hozzájárul a sejtek pusztulásához, vagy a pusztulás ellen hatva védi a sejteket az apoptózis hatásától. Az autofágia alapvetően a sejtek túlélésére evolválódott folyamat. Az autofág gének bazális aktivitása szükséges a sejtvédő funkcióhoz. Az autofágia hiperaktiválódása azonban sejthalálhoz vezethet. Feltehetően ez játszódhat le a *dut-1(RNSi)* embriók pusztulásra ítélt sejteiben is.

5.1.6. A dUTPáz inaktiválása befolyásolja a *C. elegans* öregedési folyamatát

Az öregedési folyamatot a nem kijavított sejt hibák progresszív felhalmozódása okozza (Vellai és mtsi., 2009). Az öregedési folyamat szabályozásának bizonyítéka, hogy bizonyos gének inaktiválása vagy hiperaktiválása jelentős mértékben megnyújtja az adott élőlény élettartamát. A dUTPáz enzim a hibátlan DNS bioszintézis fenntartásával járul hozzá a szervezet megfelelő működéséhez. A fehérje működésének gátlása drasztikus morfogenetikai és életképességi változásokat eredményez (előző fejezetek). Kíváncsiak voltunk arra, hogy a felnőtt állatokban iniciált dUTPáz megvonás miként befolyásolja a *C. elegans* élettartamát.

A dUTPáz gén inaktiválását L4 lárvastádiumot elérő egyedekben kezdtük el. A kontroll állatokat üres konstrukciót tartalmazó baktériumokkal tápláltuk. A vad típusú *C. elegans* féléletideje normális körülmények között körülbelül 15 nap 20°C-on. A *dut-1(RNSi)* állatok átlagosan két nappal tovább éltek a kontroll csoporthoz képest (30. ábra). Ez megközelítőleg 10%-os növekedést jelentett az élethosszban. Hasonló mértékű élettartam növekedés emberben közel 92 évre tolná ki a várható élettartamot



30. Ábra. A dUTPáz inaktiválása megnöveli az élettartamot *C. elegans*ban. Kékkel a kontroll lemezen, sárgával a dUTPáz RNS interferencia konstrukciót tartalmazó lemezen és rózsaszínnel a *dut-1* RNS interferencia konstrukciót tartalmazó lemezen mért élethosszak vannak ábrázolva.

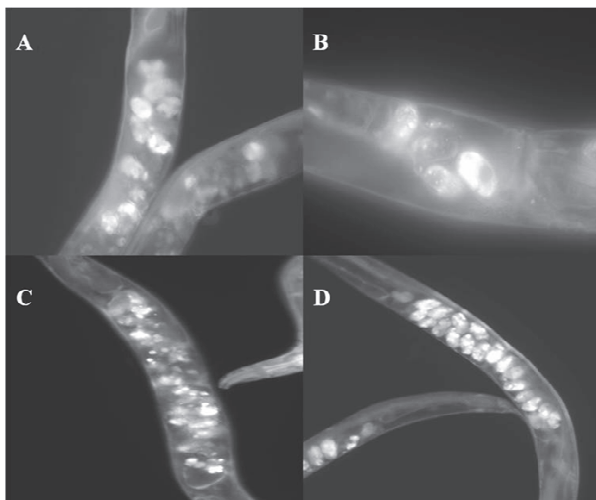
5.1.7. Sejthalált indukáló farmakológiai és genetikai inzultusok hatására az autofágia gének expressziója megnő embrionális sejtekben

Korábbi kísérleteinkkel az autofág degradáció egy új biológiai funkcióját tártuk fel: dUTPáz inaktiválás által okozott genotoxikus stressz hatására az autofág gének expressziója jelentősen megnövekszik *C. elegans* embriókban, és ez hozzájárul a károsodott sejtek eltávolításához (vagy közvetíti a sejthalált). Nyilvánvaló kérdésként merült fel, hogy az autofág gének sejtelimináló funkciója a dUTPáz útvonalban specifikus hat, vagy más stressz-indukáló faktorok hatására is aktiválódik. A kérdés megválaszolására két olyan gén funkcióvesztéses mutációit vagy géncsökkentését vizsgáltuk, amelyekről tudott volt, hogy

embrionális életképtelenséget okoznak. Az egyik gén a *dlc-1* (*dinein light chain*), a másik a *ceh-13* (*C. elegans homeobox gene-13*) *Hox* gén volt. Ezekben a mutáns vagy RNSi genetikai hátterekben az *lgg-1/Atg8* expresszióját hasonlítottuk össze a vad típusú genetikai háttérben megfigyelhető expresszióval. Mindkét gén esetében a GFP::*LGG-1* fúziós fehérje jelentős akkumulációt mutatott a vizsgált deficiens genetikai hátterekben (**31. ábra**).

Ezután olyan farmakológiai ágensekkel kezeltük a *gfp::lgg-1* konstrukciót hordozó törzset, amelyekről ismert volt embrionális életképtelenséget okozó hatásuk. Ilyen hatóanyagok az 5-fluorouracil (5-FU), a FUDR (5'-Fluoro-2'-deoxyuridin) és a metotrexát. Ezek a szerek a DNS metabolizmust befolyásolva állítják meg az egyedfejlődést. Nem véletlen, hogy potens sejtpusztító hatásuk miatt kiemelt szerepük van a kemoterápiás megközelítésekben (Fotoohi és Albertioni, 2008). Alapvetően a dUTP - dTTP átalakulást akadályozzák meg a dUTPáz enzim működésének gátlásán keresztül. Mindhárom szer alkalmazása teljes penetranciájú embrionális pusztulást eredményezett. A fejlődésben megállt embriók nagyon intenzív GFP::*LGG-1* akkumulációt mutattak (**32. és 33. ábra**). Megállapítható tehát, hogy diverz sejtpusztulást indukáló stressz-faktorok (kémiai ágensek és genetikai mutációk) hatására az autofág gének expressziós aktivitása jelentős mértékben megnő. Az autofág fehérjék akkumulációjának növekedése feltehetően az érintett sejtek pusztulását eredményezi (autofág sejtpusztulás). Ezt a feltevést erősítette meg azon megfigyelésünk, miszerint a BEC-1 fehérje masszív akkumulációja szöveti degradációval párosult (**34. ábra**).

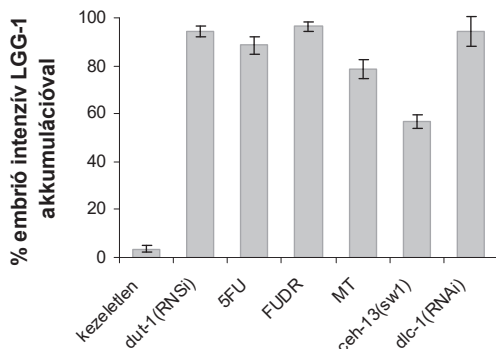
Az autofágia tehát hozzájárul a halálra ítélt sejtek eltávolításához, amennyiben azok megmentésére már nincs mód.



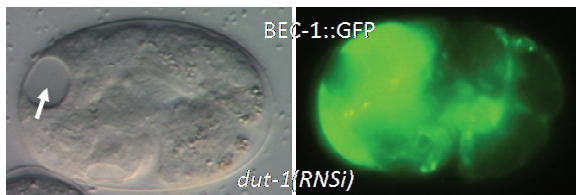
31. Ábra. Az *lgg-1* autofág gén expressziója jelentős mértékben megnő pusztuló embriókban. **A**, *dlc-1(RNSi)* állatokban a *gfp::lgg-1* transzgén intenzív expressziót mutat a pusztuló embriókban. **B**, Intenzív LGG-1 akkumuláció *ceh-13(-)* mutáns embriókban. **C**, LGG-1 akkumuláció 5FU kezelt embriókban. **D**, LGG-1 akkumuláció FUDR kezelt embriókban. Diverz embrionális letalitást okozó stressz-hatások masszív autofágia gén expressziót indukálnak.



32. Ábra. LGG-1 akkumuláció jelentősen megnövekszik 5FU kezelés hatására *C. elegans* embriókban. Felül a kezeletlen (kontroll), alul az 5FU kezelt hermafroditák láthatók. Kezelés nélkül halvány (bazális) GFP jel detektálható. A kezelt állatban az intenzíven fluoreszkáló képletek fejlődésben megrekedt embriókat jelölnek. Fluoreszcens optikával készült képek.



33. Ábra. Az LGG-1 autofágia fehérje akkumulációjának kvantifikálása. A különböző sejthalált okozó farmakológiai és genetikai beavatkozások intenzív LGG-1 akkumulációt váltanak ki embrionális sejtekben. 5FU (5'-Fluoro-uracil), FUDR (5'-fluoro-2'-deoxiuridin), MT (metotrexát).

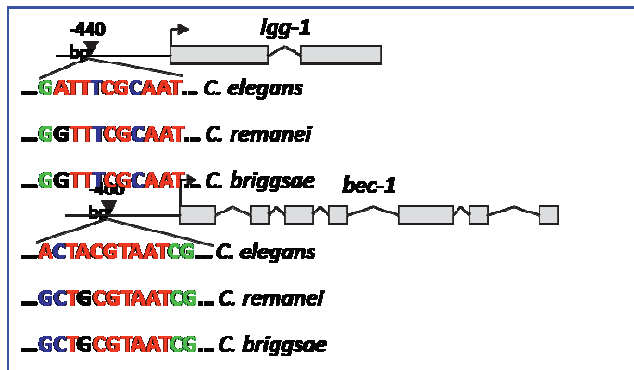


34. Ábra. A BEC-1 autofág fehérje intenzív akkumulációja szöveti degradációval párosul korai *C. elegans* embrióban. Bal oldalon egy nekrotikus degradációt mutató (nyíl) embrió DIC képe, jobb oldalon a megfelelő fluoreszcens kép. A nekrotikus területen a BEC-1 fehérje intenzíven akkumulálódik.

5.1.8. Konzervált transzkripció faktor kötőhelyek meghatározása autofág gének promóterében

Korábbi eredményeink rámutattak arra, hogy az apoptotikus és autofág folyamatok parallel aktiválódnak sejtpusztulást indukáló stressz-inzultusok hatására. Ez a megfigyelés felveti annak lehetőségét, hogy a két folyamat közös genetikai kontroll alatt áll. Ennek vizsgálata céljából a 3 korábban tanulmányozott autofágia gén – *atg-18*, *lgg-1* és *bec-1* – *upstream* szabályozó régióit hasonlítottuk össze bioinformatikai módszerekkel (ezek a gének intenzív expressziós aktivitást mutattak dUTPáz inaktiválás hatására). Olyan potenciális konzervált transzkripció faktor kötőhelyeket kerestünk a szabályozó régiókban, i, amelyekről

ismert volt, hogy az apoptózis szabályozásában is részt vesznek; ii, amelyekről megszabtuk, hogy hasonló pozícióban helyezkedjenek el mindhárom vizsgált szabályozó régióban; és iii, amelyeknek evolúciós konzerváltságot kellett mutatniuk a közel rokon *Caenorhabditis* fajok esetében is. ClustalW-alapú szekvencia illesztéssel és konzervált kötőhely kereső programok segítségével meghatároztunk egy olyan potenciális transzkripciós faktort, amely mindhárom kívánalomnak eleget tett: ez a bZip-szerű CES-2 (*cell death selection abnormal-2*) transzkripciós faktor volt. A CES-2-ről ismert volt, hogy bizonyos sejtekben az apoptotikus géncaskád *upstream* szabályozó faktoraként hat (Metzstein és mtsi., 1996). A CES-2 konzervált kötőhely meghatározott: A/G T T A C G T A A C/T (a „/” jel az alternatív nukleotidokat jelöli). Ez a kötő szekvencia teljes konzervációban megtalálható volt mindhárom vizsgált autofág gén promóter szakaszában, körülbelül 400 bp-nyira *upstream* a transzlációs iniciációs ATG starthelytől. A kötőhelyek abszolút konzervációt mutattak a *C. briggsae* és *C. remanei* ortológ szekvenciákkal is (35. ábra).



35. Ábra. Konzervált CES-2/bZip-szerű kötőhelyek az *lgg-1* és *bec-1* autofág gének szabályozó régiójában. A számok a transzlációs iniciációs starthelytől (nyíl) mért relatív pozíciókat mutatják. A pirossal jelölt bázisok az abszolút konzervált bázisok ebben a kötőhelyben. Az egyenes vonalak promóter elemeket, a boksztok exoni szekvenciákat, a boksztokat összekötő görbe vonalak introni szekvenciákat jelölnek. Az *in vitro* elemzések rámutattak arra, hogy az *atg-18* promóterben található potenciális CES-2-szerű kötőhely nem funkcionális, ezért ez kimaradt a későbbi vizsgálatokból (és ebből az ábrából).

A *C. elegans ces-2* gén egy alap leucin zipper (bZip) fehérjét kódol (Wang és mtsi., 2006). A bZip transzkripciós faktorok egy konzervált leucin zipper dimerizációs domént és egy alap DNS-kötő domént tartalmaznak. A DNS kötéshez általában dimerizálódniuk kell. Sok bZip fehérje képes homodimerek vagy heterodimerek létrehozására más bZip fehérjékkel

(Metzstein és mtsi., 1996). A fehérjék többnyire együtt expresszálódnak ugyanabban a sejtben. Fontos szerepet játszanak az élőlények fejlődésében, a cirkadián ritmus szabályozásában és az onkogenezisben. Különböző homodimer és heterodimer párok különböző szabályozó elemekhez köthetnek és így szabályozzák a célgének expresszióját.

A *ces-2* gén az NSM (szerotoninerg neuroszekréciós motoros idegsejt) sejtekben szabályozza a programozott sejthalált (Junghans és mtsi., 2004). Hatását a *ces-1* gén negatív szabályozásán keresztül valósítja meg. A *ces-1* a *Snail*-hez hasonló Zinc ujj transzkripciós faktort kódol. A CES-1 fehérje az *egl-1* gén gátlásával akadályozza meg a sejtpusztulást.

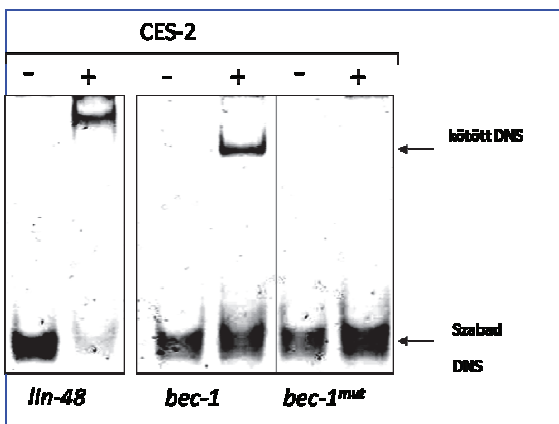
A *ces-2* a kiválasztó csősejt (*extratortary duct*) normális fejlődésében is fontos szerepet tölt be (Wang és mtsi., 2006). Ebben a sejtben a *ces-2* nem az apoptózist befolyásolja, hanem a sejt morfológiáját. A kiválasztó csősejtben molekulárisan a CES-2 aktiválja a *lin-48* gén expresszióját. A *lin-48* egy Ovo-szerű zink ujj transzkripciós faktort kódol (Wang és mtsi., 2006). A *ces-2* a *lin-48* transzkripcióját egy másik bZip faktoriall közösen szabályozza: ez az ATF-2 fehérje. A két fehérje funkciója csak az embrionális fejlődés során valósul meg, lárvá és felnőtt korban nem. Míg a *ces-2* expressziója csak az embriogenezisre korlátozódik, addig az *atf-2* aktivitása végig jelen van a fejlődés során. Az ATF-2 – a CES-2-vel ellentétben – egy esszenciális faktor: az *atf-2* funkcióvesztéses mutáns embriók közel 80%-a elpusztul, míg a *ces-2* mutáns embriók normálisan fejlődnek. Mivel az autofág gének expressziós hiperaktivitása masszív sejtpusztulással és embrionális letalitással párosul, elméleti megfontolások alapján az ATF-2 tűnt potenciális autofágia géneket szabályozó transzkripciós faktornak (expresszálódik embriókban és szükséges az embriók fejlődéséhez).

C. elegans-ban a *ces-2* gént a ZK909.4 ORF kódolja, a róla képződő fehérje 11,2 kDa-os. Az *atf-2* gént a K08F8.2 ORF kódolja, a fehérje 8,8 kDa méretű. Az *in silico* meghatározott kötőhelyek funkcionális voltának ellenőrzésére a *ces-2* és *atf-2* cDNS-ekről *in vitro* transzkripció és transzláció segítségével fehérjéket állítottunk elő, majd ezeket gélretardációs (gél *shift*; EMSA - gél elektroforetikus mobilitási *shift* vizsgálat) kísérletekben teszteltük. A vizsgálatokhoz szintetizált oligonukleotidok tartalmazták a potenciális kötőhelyeket. A kötőhelyek specificitásának igazolása céljából mutáns oligonukleotidokat is előállítottunk. A mutált kötőhelyek szerkezetét az **36. ábra** mutatja.

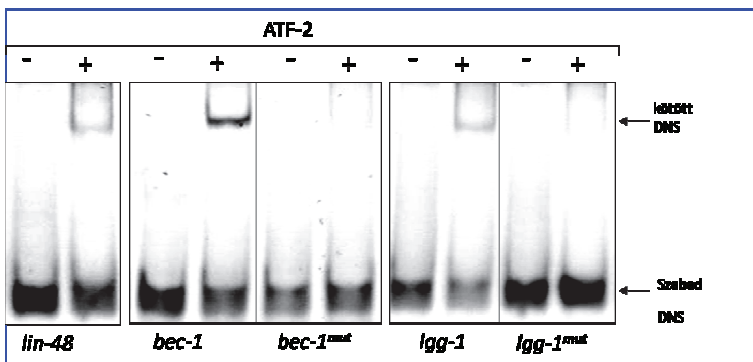
	A/G	T	T	A	C	G	T	A	A	C/T
<i>lin-48</i>	A	T	T	A	C	C	C	A	A	C
<i>bec-1</i>	A	C	T	A	C	G	T	A	A	T
<i>bec-1^{mut}</i>	A	C	A	A	T	G	T	T	G	T
<i>lgg-1</i>	A	T	T	T	C	G	C	A	A	T
<i>lgg-1^{mut}</i>	A	A	A	T	T	G	C	T	G	T

36. Ábra. A *bec-1* és *lgg-1* autofág gének szabályozó régiójában levő potenciális CES-2-szerű kötőhelyek és azok mutáns változatai. A szürkével a konzervált bázisok, a sárgával a mutáltatott bázisok vannak jelölve. Felül a konszenzus CES-2 kötőhely, alatta a *lin-48* (ismert CES-2 célgén) konzervált kötőhelye.

A géltardációs kísérletekben mind az ATF-2, mind a CES-2 képes volt kötődni a *bec-1* promóterekben található konzervált bZIP-szerű szekvenciákhoz (37. ábra). A kötőhelyek mutációs elrontása megakadályozta a fehérje-DNS kapcsolatot. Ez a kötődés szekvencia specifikus voltát mutatta. Az ATF-2 ezen felül szekvencia-specifikusan kötődött az *lgg-1* promóterben található potenciális bZip-szerű kötőhelyhez is (38. ábra).



37. Ábra. Az *in vitro* transzlált CES-2 fehérje képes kötődni a *bec-1* promóterben található potenciális bZip/CES-2-szerű kötőhelyhez. Akrilamid gél, a nukleinsavak etidium-bromiddal festve. A „-” jel a fehérje hiányát, a „+” jel a fehérje jelenlétét mutatja.



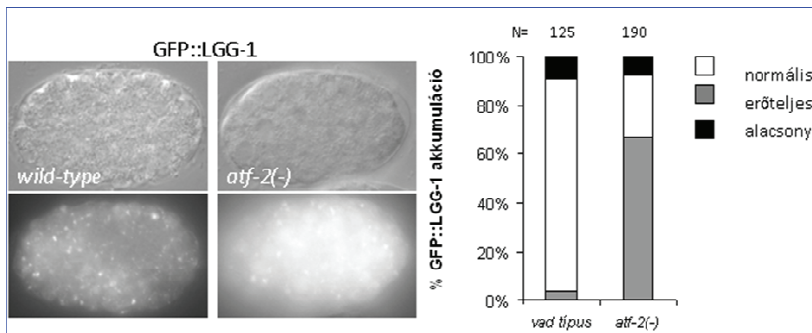
38. Ábra. Az *in vitro* transzlált ATF-2 fehérje képes kötödni a *bec-1* és *lgg-1* promóterben található potenciális bZip/CES-2-szerű kötőhelyekhez. Akrilamid gél, a nukleinsavak etidium-bromiddal festve. A „-” jel a fehérje hiányát, a „+” jel a fehérje jelenlétét mutatja.

A kísérletek azt igazolják, hogy az ATF-2 fehérje képes kötödni két autofágia specifikus gén promóterében található bZip/CES-2-szerű kötőhelyhez *in vitro*. A jelöletlen oligonukleotidok kompetálták a jelölt DNS-t, viszont a jelöletlen mutáns oligonukleotidok jelenléte nem befolyásolta a jelölt oligonukleotidok kötődési képességét. A CES-2 és ATF-2 fehérjék tehát specifikusan kötődnek az autofág gének promóteréhez. A legerősebb kötődést *bec-1* gén esetében volt megfigyelhető (erősebb, mint a pozitív kontrollként használt *lin-48* oligo), az *lgg-1* gén esetében kicsit gyengébb volt a kötődés, az *atg-18* gén esetében pedig nem tudtunk kimutatni kötődést. Az eredmények a konszenzus szekvenciától való eltérés mértékével magyarázhatóak: az *atg-18* esetében található a legnagyobb eltérés a konszenzus szekvenciától.

A CES-2 és ATF-2 fehérjék az apoptotikus sejthalál útvonalban is kulcsfontosságú szerepet játszanak (Wang és mtsi., 2006). A két sejthalál folyamat (apoptózis és autofágia) genetikai kapcsolatának tehát egy újabb színterét azonosítottuk. Genotoxikus stresszhatásokra, amikor a többi sejt és a szervezet túlélése érdekében a károsodott sejteket el kell pusztítani, a CES-2 és ATF-2 fehérjék szabályozhatják az apoptotikus és autofág útvonalak együttes hatását ebben a sejteltávolító reakcióban. Ha van még remény a sejt megmentésére és csak bizonyos sejtalkotókat kell eltávolítani, akkor az autofágia aktiválódik. Ha már nincs esély a túlélésre, akkor a két útvonal együttes szabályozásával megy végbe a degradáció.

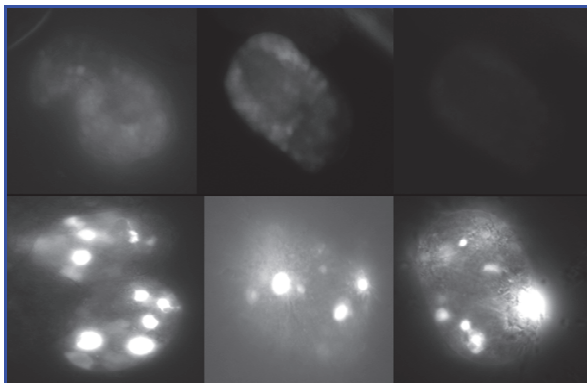
5.1.9. Az ATF-2 autofágia génexpressziót szabályozó szerepének *in vivo* bizonyítása

Az *in vitro* kötőhely elemzés bizonyítása után szerettük volna *in vivo* is igazolni az ATF-2 transzkripciós faktor autofág génekre vonatkozó szabályozó hatását. Ez a vizsgálati módszer a szabályozás természetére (aktiválás vagy gátlás) is választ adhat. *atf-2* funkcióvesztéses mutáns genetikai háttérben vizsgáltuk az *lgg-1* gén expresszióját. Az LGG-1 fehérje akkumulációja jelentős mértékben megnőtt *atf-2(-)* mutáns háttérben, a vad típusú háttérrel összehasonlítva (39. ábra).



39. Ábra. Az ATF-2 gátolja az *lgg-1* expresszióját korai embriókban. Bal oldalon felül egy *gfp::lgg-1* transzgént hordozó vad típusú genetikai háttérű és egy *atf-2(-)* mutáns embrió DIC képe. Alul a megfelelő embriók fluoreszcens képe. A fehér pontok autofág struktúrákat jelölnek. A fluoreszcens képek azonos expozíciós idővel készültek. Jobb oldalon az LGG-1 akkumuláció kvantifikálása vad típusú és *atf-2(-)* mutáns genetikai háttérben. A vizsgált embriók száma (N) az oszlopok felett feltüntetve.

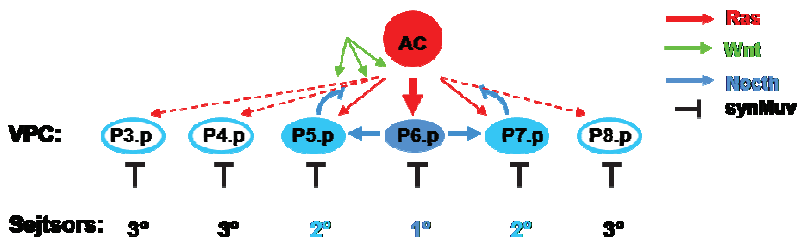
Megvizsgáltuk az *atf-2* expresszióját *dut-1* deficiens embriókban is: arra kerestünk választ, vajon az ATF-2 képes-e aktiválódni genotoxikus stressz-hatásokra. Konzisztensen a korábbi eredményeinkkel, egy *atf-2::gfp* riporter konstrukciót hordozó állatokban az ATF-2 akkumulációja jelentős mértékben növekedett a dUTPáz inaktiválásának hatására (40. ábra). A fejlődésben megrekedt embriókban a fehérje halmozódás szintje megnövekedett, és eloszlása is granulárisrá vált.



40. Ábra. Egy *atf-2::gfp* riporter gén expressziója jelentősen megnövekszik genotoxikus stressz hatására *C. elegans* embriókban. Felső sor: kezeletlen *atf-2::gfp* transzgénikus embriók, alsó sor: *dut-1* RNSi konstrukcióval kezelt *atf-2::gfp* transzgénikus állatok. Fluoreszcens képek.

5.2. A dUTPáz kapcsolata a synMuv útvonalakkal

A *dut-1(RNSi)* állatok egyik jellemző fenotípusa a vulvaszövet kitüremkedése (Pv1 fenotípus). Ez felvetette annak lehetőségét, hogy a dUTPáz enzim befolyásolja a vulvaszövet fejlődését. A vulva a *C. elegans* hermafrodita állatok azon szerve, amelyen keresztül a hím spermái bejutnak, ill. az embriók a külvilágba jutnak. A vulva kialakulása hat darab vulva elősejtből indul ki az L3 lárvastádium elején (addig az állat egy „zárt cső”) (Horvitz és Sternberg, 1991). A vulva elősejtek három sejtorsó irányába differenciálódhatnak: elsődleges, másodlagos és harmadlagos vulvasejtek. A vulva fejlődését számos jelátviteli útvonal befolyásolja. Ezek közé tartozik az RTK/Ras/MAPK (receptor tirozin-kináz/Ras/mitogén aktivált fehérje kináz), a Wingless, a Notch, a synMuv (szintetikus Multivulva) és a szex-determinációs géncaskád (Horvitz és Sternberg, 1991, Szabo és mtsi., 2009). A Ras útvonal aktiválja a vulva fejlődését. A *synMuv* gének a vulva kialakulását gátolják azáltal, hogy a Ras útvonal komponenseinek működését gátolják. A *synMuv* gének három redundánsan működő csoportra oszthatóak: A, B és C útvonalak. Bármelyik *synMuv* osztályba tartozó gén funkcióvesztéses mutációja nem okoz változást a vulva fejlődésében. Ha két tetszőleges *synMuv* útvonalba tartozó gén funkcióvesztéses mutációit kombináljuk, akkor a kettős mutánsokban Multivulva (Muv) fenotípus alakul ki (a vulvafejlődés hiperaktiválódik). A Muv állatok hasi oldalán kettő vagy több vulvakivégzés látható.



41. Ábra. A vulva fejlődését szabályozó jelátviteli útvonalak. A Ras, a Wnt, a Notch és a synMuv jelátviteli útvonalak összehangolt működése szükséges a vulva normális fejlődéséhez. A synMuv útvonal a vulvafejlődés fő gátlója.

A vulva fejlődésének egy másik fontos szabályozó faktora a Ras útvonal. A Ras jelátvitel egyik kulcskomponense a LET-60 fehérje, amely az emlős RAS fehérjék nematoda ortológja. *let-60* funkcióyeréses mutáns állatok Muv fenotípust mutatnak.

Annak vizsgálatához, hogy a dUTPáz kölcsönhat-e a *synMuv* génekkel a vulvafejlődés során, először *let-60(gf)* mutáns állatokat kezeltünk *dut-1* duplaszálú RNS-sel. Kontrollként üres vektorral etetett állatokat használtunk. A dUTPáz enzim inaktiválása közel felére csökkentette a vulvaszámot *let-60(gf)* mutáns háttérben. Ezután *synMuv AB* kettős mutáns állatokban inaktiváltuk a dUTPáz-t. A *lin-8;lin-15* kettős mutánsokban 35%-kal, a *lin-8;lin-35* kettős mutánsokban pedig 27%-kal csökkent a vulvaindukció mértéke az üres vektorral történő kezeléshez képest (3. táblázat). A dUTPáz aktivitása tehát szükséges a *synMuv* kettős mutánsokban a Muv fenotípus megnyilvánulásához. Ez a hatás feltehetően az intenzíven osztódó vulvasejtek pusztulásán keresztül valósul meg.

4. Táblázat. A dUTPáz inaktiválása *synMuv AB* kettős mutáns állatokban szuppressálja a Muv fenotípus expresszivitását.

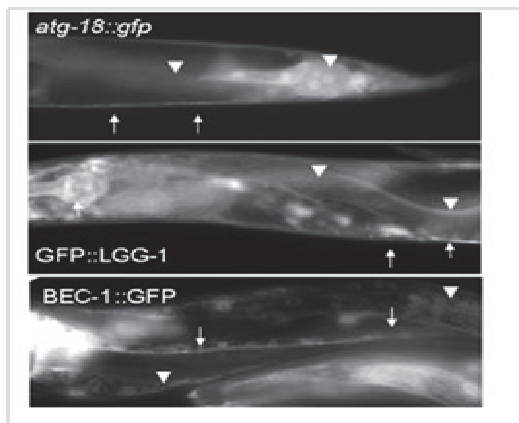
Genotípus	Átlagos vulvaszám	Átlagos vulvaszám <i>dut-1(RNSi)</i> genetikai háttérben
<i>let-60</i> (<i>Ras hiperaktív</i>)	2,5	1,2
<i>lin-8;lin-35</i> (<i>synMuv AB</i>)	2,29	1,6
<i>lin-8;lin-15</i> (<i>synMuv AB</i>)	2,8	2,2

Kezelt-kezeletlen összehasonlításokban $p < 0.0001$, párosítatlan *t*-teszt.

5.3. Az autofág gének szerepe az élethossz szabályozásában

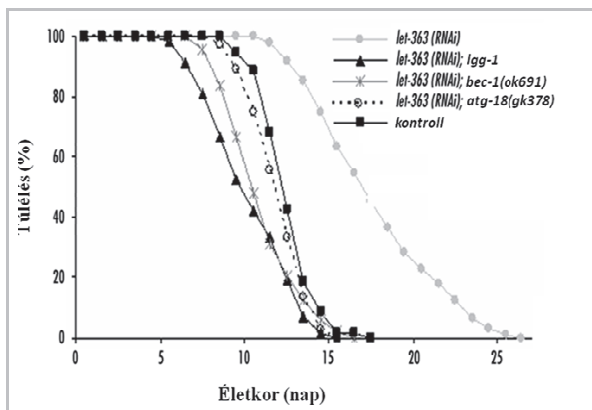
Az öregedési folyamat szabályozása összetett folyamat. Számos faktor befolyásolja, amelyek közé környezeti tényezők (pl. hőmérséklet, tápanyag ellátottság, oxigén szint, kémiai hatóanyagok) és endogén faktorok (pl. a mitokondriális légzési lánc, az inzulin/IGF-1, TGF-beta, Ras és TOR kináz közvetített jelátviteli rendszerek, transzkripció faktorok - pl. FoxA -, és szabályozó fehérjék – p53) egyaránt tartoznak (Vellai és mtsi., 2009). A TOR kináz az autofágia egyik *upstream* szabályozó faktora, ezért funkcióvesztéses autofág mutáns törzsek élettartamát is megvizsgáltuk annak megválaszolására, hogy az autofágia szerepet játszik-e az öregedési folyamat szabályozásában. *bec-1* mutáns állatok lényegesen rövidebb ideig éltek a vad típusnál (**43. ábra**). Mivel a BEC-1 egy multifunkcionális fehérje, további autofágia deficiens mutáns fonalférgek élettartamát is megvizsgáltuk annak eldöntésére, hogy a *bec-1* mutánsokban valóban az autofágia hiánya okozta-e az élethossz rövidülését. Ennek érdekében *atg-18(-)* mutáns és *lgg-1* géncsendesített állatok élettartamát mértük meg. Az *atg-18* gén terméke a pre-autofagoszómális struktúra kialakításában és a reciklizációs folyamatokban egyaránt fontos szerepet játszik (Vellai és mtsi., 2009). Az *lgg-1* egy ubikvitin-szerű fehérjét kódol, melynek lipidációja nélkülözhetetlen a membránképződéshez az autofágia során (Khalfan és Klionsky, 2002). Ezek az autofágia deficiens állatok szintén rövidebb ideig éltek, mint a vad típus (**43. ábra**). Ezzel párhuzamosan három autofágia-specifikus gén expressziós analízisét is elvégeztük: az *atg-18*, *lgg-1* és *bec-1*. Mindhárom gén olyan szövetekben

expresszálódott, amelyek ismertén központi szerepet játszanak a fonalférgek élettartamának szabályozásában (bél és idegrendszer) (42. ábra).



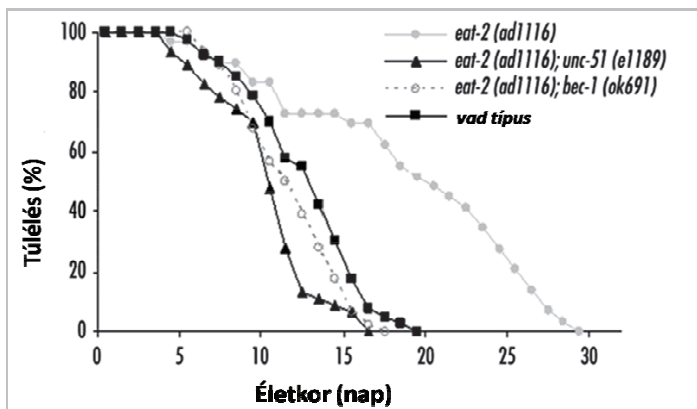
42. Ábra. Az autofág gének expresszálódnak az idegszövetben és a bélszövetben *C. elegans*-ban. Fluoreszcens képek. Az *atg-18::gfp* egy transzkripciós fúziós konstrukció, míg a GFP::LGG-1 és BEC-1::GFP transzlációs fúziós konstrukciók. A két utóbbi riportter konstrukció képes menekíteni – legalábbis részlegesen – a megfelelő autofágia mutáns állatok pleiotróp fenotípusát.

A TOR kináz inaktiválása – amelelt, hogy aktiválja az autofág degradációt – megnöveli az élethosszt élesztőben, *Drosophilában*, *C. elegans*-ban és egérben (Melendez és Levine, 2003; Vellai és mtsi., 2003). A TOR kölesönhat az inzulin/IGF-1 jelátviteli útvonallal az élethossz szabályozásában (Vellai és mtsi., 2003). Mivel a TOR gátolja az autofág folyamat működését és az autofágia szerepet játszik az öregedési folyamat szabályozásában, kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon az autofág gének aktivitása szükséges-e a TOR mutáns állatok hosszú élettartamának megnyilvánulásához. Másképpen fogalmazva, az autofág gének közvetítik-e a TOR élethossz-befolyásoló hatását. TOR deficiens mutáns állatok élettartamát mértük meg különböző autofágia defektív genetikai hátterekben. Azt találtuk, hogy az autofág gének inaktiválása (*atg-18*, *lgg-1* és *bec-1*) szuppresszálja a TOR mutánsok megnyúlt élethosszát (43. ábra). A TOR-autofágia deficiens kettős mutáns fonalférgek közel addig éltek, mint az autofágia deficiens egyszeres mutáns állatok. A TOR és az autofág génkaszkád tehát egy útvonalban hat az öregedési folyamat szabályozásában. Ebben az útvonalban az autofág gének aktivitását a TOR kináz negatívan szabályozza.



43. Ábra. TOR deficiens (*let-363* mutáns) fonalférgek megnyúlt élettartamát az autofág gének inaktiválása szuppresszálja. Mivel az autofág gének inaktivációja jobban csökkenti az élettartamot TOR deficiens, mint vad genetikai háttérű állatokban, az autofág gének élettartamot befolyásoló hatása az öregedési folyamat szabályozásán keresztül valósul meg.

Régóta ismert tény, hogy a kalorikus restrikción (csökkentett táplálék felvétel) megnöveli az élethosszt és gátolja az öregkori degeneratív rendellenességek kialakulását számos állati taxonban (Toth és mtsi, 2008). Az eukarióta sejtek energiállapotának szenzora a TOR kináz, míg az autofágia (amelyet a TOR szabályoz) befolyásolja az öregedési folyamatot. Ezen ismeretek birtokában releváns volt megkérdeznünk, hogy az autofág gének szükségessé-e kalorikus restrikciónak kitett állatok hosszú életidejű (*long-lived*) fenotípusának kialakulásához. Ennek megválaszolásához *eat-2(ad116)* funkcióvesztéses mutánsokban blokkoltunk autofágia specifikus gének aktivitását, és megmértük az állatok élettartamát. Az *eat-2* egy garatműködéséhez szükséges komponenst kódol; hiányában a garatműködés lelassul és az állat endogén módon kalorikusan csökkent módon táplálkozik. Autofág gének inaktiválása szuppresszálta az *eat-2* mutánsok hosszú élettartamát. A kettős mutáns állatok az autofágia deficiens egyszeres mutáns állatok élethosszát mutatták (44. ábra). A genetika nyelvén ez azt jelenti, hogy az autofág gének és a kalorikus restrikción közvetítő genetikai faktorok egy útvonal mentén hatnak az élettartam szabályozásában, és ebben az útvonalban az autofág génkaszkád hat *downstream*. Az *eat-2* gén élethosszszabályozó hatását tehát az autofág gének közvetítik.



44. Ábra. Az *eat-2* mutáns fonalférgek hosszú életidejét az autofág gén inaktiválása szuppresszálja. Az *eat-2(ad1116)* mutánsok hosszabb ideig élnek a vad típusnál. Ezekben a mutánsokban az autofágia blokkolása megátalja a hosszú élettartam kialakulását.

Fentebb bemutatott eredményeink azt mutatják, hogy a TOR jelátvitel és a kalorikus restriktió közvetítő gének élethossz befolyásoló hatásai az autofág génkaskádon konvergálnak. Az autofágia tehát nem csak befolyásolja az öregedési folyamatot fonalférgekben, hanem az öregedési folyamat központi szabályozó mechanizmusa.

6.KÖVETKEZTETÉSEK

Az autofágia az eukarióta sejtek szabályozott önemésztő folyamata, amely során a citoplazma egy része lizoszómákba jut, ahol végül lizoszómális hidrolázok által degradálódik. Az így keletkezett építőkövek aztán újrahasznosulhatnak a felépítő folyamatokban vagy energiát szolgáltatnak a sejt számára éhezés során. Az autofágia tehát elsődlegesen a sejt túlélését biztosító mechanizmus. Az autofágia azonban számos fiziológiai és patológiai folyamatban a sejtpusztulás inherens része (Cuervo, 2004; Hara és mtsi., 2006). Feltehetően az autofág folyamat hiperaktivitása vagy hiánya vezethet sejtpusztuláshoz. Orvosbiológiai és egyedfejlődési jelentősége ellenére azonban ma sem tisztázott, hogy az autofágia önmagában, az apoptotikus folyamattal karöltve vagy azzal ellentétesen hatva befolyásolja a sejt pusztulását. Doktori munkám során olyan sejtpusztulási modellt kívántam felállítani, amelyben az autofág gének aktivitása és funkciója jól vizsgálható. Ehhez a dUTPáz inaktiválása bizonyult kiváló kísérletes paradigmának. Az enzim esszenciális szerepet tölt be a normális DNS metabolizmusban. A dUTPáz inaktiválása *C. elegans*ban embrionális letalitást eredményezett. Az elpusztuló dUTPáz deficiens [*dut-1(RNSi)*] embriókban tömeges sejthalált detektáltunk. Vizsgálataim első szakaszában a *C. elegans* dUTPázt kódoló *dut-1* gén genetikai analízisét végeztem el.

7.1. A *dut-1* gén inaktiválása embrionális letalitást eredményez

A dUTPáz enzimet *C. elegans*ban egyetlen gén, a K07A1.2 ORF (*dut-1* gén) kódolja. Erre a génre mutáns *C. elegans* törzs nem létezik, ezért a szekvencia adatok alapján RNS interferencia konstrukciót készítettünk a gén inaktiválásához. Vad típusú és RNS interferencia érzékeny férgekkel kezeltem az elkészített *dut-1* RNSi konstrukcióval. A *dut-1* gén csendesítése pleiotróp fenotípust eredményezett. Sterilitás, morfológiai abnormalitás (pl. vulvafejlődési rendellenességek), és embrionális letalitás jellemezte a *dut-1(RNSi)* állapotokat. dUMP etetéssel bebizonyítottam, hogy a megfigyelt rendellenességekért valóban a dUTPáz fehéreje hiánya (timin-mentes DNS metabolizmus) a felelős.

*C. elegans*ban – a többi élőlényhez hasonlóan – a dUTPáz alapvető fontosságú a szervezet életben maradásához és normális fejlődéséhez. A sejtek túlélésében is fontos szerepet tölt be. Inaktiválása masszív sejtpusztulást idéz elő embriókban.

7.2. dUTPáz deficiens fejlődésben megrekedt embriókban az autofág gének expressziója hiperaktiválódik

Az általánosan elfogadott nézet szerint a dUTPáz inaktiválás által okozott genotoxikus stressz az apoptotikus rendszer aktiválásán keresztül okoz sejtpusztulást. A tumorsuppresszor p53 fehérje központi szerepet játszik a DNS hibák észlelésében és az apoptotikus génaskád aktiválásában. *C. elegans*-ban azonban a p53 ortológ CEP-1 fehérje nem befolyásolja *dut-1* RNSi által okozott sejtpusztulási folyamatokat (Deng és mtsi., 2007). Ezzel összhangban azt találtuk, hogy a fejlődésben megrekedt *dut-1(RNSi)* embriókban az apoptotikus sejtek mennyisége csak mérsékelten növekedett a kezeletlen kontroll embriókhoz képest. Ezek a megfigyelések felvetették egy másik, alternatív sejthalál mechanizmus szerepét a dUTPáz inaktiválás által kiváltott sejtpusztulási folyamatokban. Kandidáltként az autofág génaskád jött számításba.

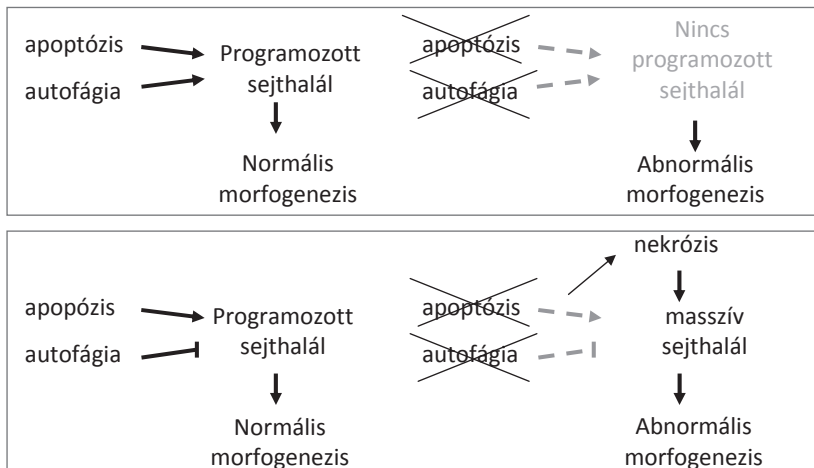
Hipotézisünk tesztelésére először autofágia specifikus gének expresszióját vizsgáltuk meg pusztuló *dut-1(RNSi)* embriókban. Az *atg-18*, *lgg-1* és *bec-1* autofág gének expresszióját tanulmányoztuk. Mindhárom gén (ill. fehérje) jelentős expressziós aktivitást mutatott dUTPáz inaktiválás hatására. Az erre vonatkozó fluoreszcens eredményeinket elektronmikroszkópos módszerrel is megerősítettük. A pusztuló *dut-1(RNSi)* embriókban számos autofág struktúrát tudtunk detektálni. Ez ezért volt izgalmas megfigyelés, mert az ezt megelőző években nem tudtunk autofág elemeket kimutatni a *C. elegans* embriogenezis folyamán. 5 év sikertelen autofágia indukáló erőfeszítése után a sejtpusztulást okozó dUTPáz inaktiváció potens autofág induktornak bizonyult. Ezekből az eredményekből azt következtethető, hogy a genotoxikus stressz az autofág rendszer (hiper)aktiválásán keresztül okoz masszív sejthalált. Ennek az állításnak az orvosi biológiai vonatkozása számottevő. Az autofág génaskád hiperaktiválása ugyanis potenciálisan tumorsuppresszor hatású.

7.3. Embrió letalitást okozó stresszhatások az autofág génaskád expresszióját hiperaktiválják

Az általunk feltett következő kérdés az volt, vajon az autofág rendszer a dUTPáz inaktiválásra specifikusan hat, vagy általános szerepet játszik a sejtes stressz-válaszban. A kérdés megválaszolására autofág gének expresszióját vizsgáltuk sejtpusztulást okozó genetikai és farmakológiai behatásoknak kitett embriókban (vs. vad típusú genetikai háttér). Ehhez kísérletesen a *dlc-1* és *ceh-13* esszenciális géneket inaktiváltuk, ill. 5FU, FUDR és metotrexát kezelést alkalmaztunk. Ezek a kémiai vegyületek az osztódó (replikálódó) sejteket

pusztítják el. Minden vizsgált gén (*atg-18*, *lgg-1* és *bec-1*) esetben masszív autofág génexpressziós aktivitást tapasztaltunk. Az autofágia tehát általános mechanizmusként szolgálhat a metabolikusan károsodott sejtek eltávolításában. Ezek az eredmények az autofágia új potenciális egyedfejlődési funkcióira mutatnak rá. Számos programozott sejthalál folyamat ugyanis feltehetően autofág elemeket tartalmaz. Ez megmagyarázhatja, miért életképesek az apoptózis deficiens nematoda törzsek és miért tudnak kifejlődni az apoptózis mutáns emlős embriók. Elképzelhető ugyanis, hogy az apoptózis hiányában az autofág rendszer túlműködése közvetíti bizonyos sejtek pusztulását. Ezt a jövőben kiválóan lehet tanulmányozni apoptózis deficiens *ced-4* genetikai null mutáns nematodák sejtvonalaival (a CED-4 szükséges a kaszpáz-függő és -független sejthalál kivitelezéséhez). Vajon valóban 131 szomatikus sejtrel több marad ezekben a mutánsokban (ennyi sejt hal meg ugyanis programozott módon a *C. elegans* normális egyedfejlődése folyamán)? Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy az autofág folyamat sokkal jelentősebb szerepet játszik a korai egyedfejlődésben, mint ahogyan azt korábban gondolták. Az autofág rendszer ezen funkciója azonban redundánsan hat az apoptotikus génkaskáddal (45. ábra), és ezért autofágia deficiens egyszeres mutánsok vizsgálatával nem kimutatható.

A másik fontos következtetésünk a sejtpusztulást okozó kémiai szerek autofágiát stimuláló hatásából ered. Az 5FU, FUDR és metotrexát a DNS metabolizmust befolyásoló ágensek; a dUTP dTTP-vé történő konverzióját blokkolják. Rákos megbetegedések gyógyításában a kórosan osztódó sejtek elpusztításában használják ezeket a vegyületeket. Működésük mechanizmusáról, és azokról a sejtes folyamatokról, amelyeken keresztül kifejtik hatásukat, viszonylag keveset tudunk. Eredményeink szerint a DNS metabolizmus perturbációja autofágiát aktivál, és ezen keresztül pusztítja el a károsodott sejteket. Az autofág rendszer tehát kitüntetett célpontja a rákterápia köré szerveződő jövő farmakológiai vizsgálatoknak. Összefoglalva, az autofág folyamat potens sejtelimináló képességgel rendelkezik. Az autofágia tehát egy kétélű kard: normális esetben védi a sejteket a pusztulástól, bizonyos egyedfejlődési lépésekben és patológiás körülményekben viszont elsődleges eszköze a sejt elpusztításának.



45. Ábra. Az autofágia potenciális szerepe a programozott sejthalálban. Két alternatív modell. Az elsőben (felső panel) az autofágia közvetíti a programozott sejthalált, ebben az apoptotikus rendszerrel parallel hat. A másik modellben (alsó panel) az autofágia gátolja a programozott sejthalált. Apoptózis és autofágia hiányában alternatív sejthalál útvonalak (pl. nekrosis) aktiválódnak, amelyek masszív sejthalált, és végül az organizmus pusztulását eredményezik. A nyilak aktiválást, a talpas nyilak gátlási viszonyokat jelölnek.

7.4. Az apoptózis és az autofágia gyakran együtt aktiválódik bizonyos fiziológiai és patológiai kondíciókban

Az apoptózist jellemző morfológiai változások kísérik. Ezek közül az egyik a pusztuló sejt maganyagának fragmentálódása, a másik a pusztuló sejt fénytörő képességének megváltozása. E két tulajdonságuk alapján lehet az apoptotikus sejteket eredményesen meghatározni: a refraktilis (fénytörő) apoptotikus testeket DIC optika segítségével lehet azonosítani, ill. a töredező kromatin struktúrárt hisztokémiai módszerrel (TUNEL, terminális deoxinukleotidil transzferáz közvetített hasítási végjelölés) lehet azonosítani. A vad típusú és a kezeletlen állatokhoz képest „csak” 2-3-szor több apoptotikus test található a dUTPáz defektív genetikai háttérű állatokban. Ez nem olyan mértékű növekedés, amit az irodalom alapján vártunk volna. Mindenesetre elmondható, hogy az apoptotikus és autofág folyamatok ko-indukálódnak genotoxikus stressz hatására. Ez felveti a két sejthalál rendszer (sejtes öngyilkosság – apoptózis és sejtes önemésztés – autofágia) közös evolúciós fejlődését (taln eredetét) és egyedfejlődési funkcióját.

7.5. A *C. elegans*ban csak egyféle dUTPáz izoforma van?

Az eukarióta élőlényekben a dUTPáz enzimnek két izoformája fordul elő: egy sejtmagi és egy mitokondriális forma. A két fehérje ugyanarról a génről képződik alternatív RNS szerkesztés révén. A sejtmagi forma sejtciklushoz kötődő időszakos aktivitást mutat, a mitokondriális forma viszont konstitutív, sejtciklustól független expressziós mintázattal rendelkezik. A sejtmagi forma nagyobb a sejtmagi lokalizációs szignál miatt.

A *C. elegans* dUTPáz fehérje némiképp eltér a többi élőlényben eddig megismerttől. Fehérjegyében a kontroll *Drosophila* fehérjék mellett csak egyetlen nematoda izoforma látható, a hosszabb sejtmagi. A mitokondriális forma valószínűleg annyira labilis vagy annyira kis mennyiségben van jelen, hogy nem detektálható. Előfordulhat azonban, hogy az invariáns sejtvonallal rendelkező nematoda egyedfejlődés valóban nélkülözi az egyik (feltehetően rövidebb) dUTPáz izoformát. Felnőtt állatokban a testi sejtek már nem osztódnak, ezért nem fordulnak elő a replikáció során kialakuló DNS hibák. Elképzelhető, hogy a hosszabb izoforma funkcionál a mitokondriumokban is.

7.6. A *C. elegans* dUTPáz redukált expressziója

A normálisan működő sejtekben a dUTPáz enzim a sejtmagban ill. a citoplazmában (mitokondriumokban) lokalizálódik. A szakirodalom szerint az intenzíven osztódó sejtek mutatják a legnagyobb enzimatisz aktivitást. Ezért *C. elegans*ban a *pre-comma* állapotú embriókban határoztuk meg a dUTPáz fehérje akkumulációját, mivel bennük sok osztódó szövet található. Meglepetésünkre ezekben az embriókban csupán 1-2 sejt mutatott dUTPáz akkumulációt (a sejtek identitását nem tudtuk meghatározni) egy lacZ-alapú riporter rendszer segítségével.

A fehérje expressziós mintázatának meghatározásához nyúlban termelt monoklonális dUTPáz specifikus ellenanyagot is használtunk. Az antitest festési eljárás ugyancsak 1-2 dUTPáz-pozitív sejtet tudott csak meghatározni egy-egy fejlődési stádiumban. Mindkét expressziós kísérlet során ugyanarra az eredményre jutottam: a *comma* és *pre-comma* korú embriókban alig vannak dUTPáz akkumuláló sejtek. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a dUTPáz nem expresszálódik minden sejtben, csak a legintenzívebben osztódó sejtekben. Másik érdekessége az antitestfestéses kísérleteknek, hogy az enzim intracelluláris lokalizációja dominánsan citoplazmatikus. Ez azért különös, mert a korábbi fehérjevizsgálatok a hosszabb, sejtmagi forma jelenlétét mutatták ki, amelynek elhelyezkedése a sejtmagban várható. Magyarázatként elképzelhető, hogy a sejtmagi izoforma

aktivitása összefüggést mutat a sejtciklussal. Az enzim aktivitása ennek során egy bizonyos ponton éri el maximumát, valószínűleg a DNS szintézis előtti időszakban, hiszen akkor van a legnagyobb szükség az intakt DNS-re. Ez a maximális enzim mennyiség detektálható is. A sejtciklus más szakaszaiban viszont csak nem kimutatható bazális szint jellemzi a dUTPáz akkumulációját; ilyenkor a dUTP/dTTP egyensúly az enzim működése nélkül is fenntartható.

Egy másik magyarázat szerint az enzim azért mutat citoplazmatikus lokalizációt, mert normális körülmények között a fehérje nagyobb mennyiségben a citoplazmában halmozódik, és csak stressz-körülmények között transzportálódik a sejtmagba a sejtmagi lokalizációs szignál segítségével. Feltehetően a bazális sejtmagi szint nem, vagy csak nehezen mutatható ki.

7.7. Az autofág és apoptotikus génkaskádok közös transzkripcionális szabályozása

Három autofág gén (*lgg-1*, *bec-1* és *atg-18*) transzkripcióis aktivitása jelentős mértékben megnövekedett dUTPáz inaktiválás hatására. Ez a megfigyelés felvetette az autofág gének expressziós szabályozásának koordinált lehetőségét a stressz-indukált sejtválasz folyamatokban. Bioinformatikai eszközökkel egy olyan transzkripcióis faktor kötőhelyet azonosítottunk a 3 vizsgált autofág gén promóterében, amely a közel rokon *Caenorhabditis* fajokban is konzerváltan fordul elő hasonló genomi környezetben. Ez a transzkripcióis faktor a bZip-szerű CES-2 fehérje volt. A CES-2 paralógja az ATF-2 fehérje. Mindkét transzkripcióis faktorról ismert volt, hogy részt vesznek az apoptotikus génkaskád szabályozásában. A két alternatív sejthalál útvonalat tehát közös transzkripcióis szabályozás kapcsolja össze. Ezzel magyarázható az autofág és apoptotikus gének redundáns egyedfejlődési funkciói, valamint közös részvételük a stressz-indukált sejtelimináló folyamatokban.

A fehérje expressziós mintázatának meghatározásához nyúlban termelt monoklonális dUTPáz specifikus ellenanyagot is használtunk. Az antitest festési eljárás ugyancsak 1-2 dUTPáz-pozitív sejtet tudott csak meghatározni egy-egy fejlődési stádiumban. Mindkét expressziós kísérlet során ugyanarra az eredményre jutottam: a *comma* és *pre-comma* korú embriókban alig vannak dUTPáz akkumuláló sejtek. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a dUTPáz nem expresszálódik minden sejtben, csak a legintenzívebben osztódó sejtekben. Másik érdekessége az antitestfestéses kísérleteknek, hogy az enzim intracelluláris lokalizációja dominánsan citoplazmatikus. Ez azért különös, mert a korábbi fehérjevizsgálatok a hosszabb, sejtmagi forma jelenlétét mutatták ki, amelynek elhelyezkedése a sejtmagban várható. Magyarázatként elképzelhető, hogy a sejtmagi izoforma

aktivitása összefüggést mutat a sejtciklussal. Az enzim aktivitása ennek során egy bizonyos ponton éri el maximumát, valószínűleg a DNS szintézis előtti időszakban, hiszen akkor van a legnagyobb szükség az intakt DNS-re. Ez a maximális enzim mennyiség detektálható is. A sejtciklus más szakaszaiban viszont csak nem kimutatható bazális szint jellemzi a dUTPáz akkumulációját; ilyenkor a dUTP/dTTP egyensúly az enzim működése nélkül is fenntartható.

Egy másik magyarázat szerint az enzim azért mutat citoplazmatikus lokalizációt, mert normális körülmények között a fehérje nagyobb mennyiségben a citoplazmában halmozódik, és csak stressz-körülmények között transzportálódik a sejtmagba a sejtmagi lokalizációs szignál segítségével. Feltehetően a bazális sejtmagi szint nem, vagy csak nehezen mutatható ki.

7.7. Az autofág és apoptotikus génkaskádok közös transzkripcionális szabályozása

Három autofág gén (*lgg-1*, *bec-1* és *atg-18*) transzkripciósi aktivitása jelentős mértékben megnövekedett dUTPáz inaktiválás hatására. Ez a megfigyelés felvetette az autofág gének expressziós szabályozásának koordinált lehetőségét a stressz-indukált sejtválasz folyamatokban. Bioinformatikai eszközökkel egy olyan transzkripciósi faktor kötőhelyet azonosítottunk a 3 vizsgált autofág gén promóterében, amely a közel rokon *Caenorhabditis* fajokban is konzerváltan fordul elő hasonló genomi környezetben. Ez a transzkripciósi faktor a bZip-szerű CES-2 fehérje volt. A CES-2 paralógja az ATF-2 fehérje. Mindkét transzkripciósi faktorról ismert volt, hogy részt vesznek az apoptotikus génkaskád szabályozásában. A két alternatív sejtthalál útvonalat tehát közös transzkripciósi szabályozás kapcsolja össze. Ezzel magyarázható az autofág és apoptotikus gének redundáns egyedfejlődési funkciói, valamint közös részvételük a stressz-indukált sejtelimináló folyamatokban.

Az *in silico* azonosított kötőhelyek funkcionális bizonyítását a *ces-2* és *atf-2* cDNS-ekről *in vitro* transzkripció és transláció során termelt fehérjével végzett DNS - fehérje kötési gélretardációs kísérletekkel igazoltuk. A CES-2 és ATF-2 fehérjék képesek kötni az intakt kötőhelyet tartalmazó *bec-1* promóterből származó oligonukleotidhoz. A kötőhely mutációs elrontása meggátolta a DNS-fehérje kötést; a CES-2 és ATF-2 tehát szekvencia specifikusan kötődik a *bec-1* szabályozó régióhoz *in vitro*. Hasonló specifikus kötést azonosítottunk az ATF-2 és az *lgg-1* promóterben található potenciális bZip-szerű kötőhely között. Az ATF-2 tehát olyan transzkripciósi faktor, amely parallel szabályozza az autofág és apoptotikus génkaskád transzkripciósi aktivitását. Az ATF-2 esetében *in vivo* is sikerült igazolnunk az *lgg-1*-re vonatkozó transzkripciósi szabályozási kapcsolatot. *atf-2(-)* mutáns genetikai

hátterben az LGG-1 akkumulációja jelentősen megnövekedett, tehát az ATF-2 represszálja az *lgg-1* expresszióját. Hasonló szabályozási kapcsolatot tártunk fel az ATF-2 és a *bec-1* promóterben található bZip-szerű kötőhely viszonyában is (Erdélyi Péter készülő doktori tézis). Eredményeinkkel új biológiai funkciót tudunk társítani egy kevésbé jellemzett *C. elegans* transzkripciós faktorhoz: az ATF-2 új célgénjeit (*bec-1* és *lgg-1*) határoztuk meg.

A biológiai kutatások egyik legújabb forradalma kétségkívül az autofágia mechanizmusának és szabályozásának területén zajlik. Autofág gének transzkripciós aktivitásának szabályozására vonatkozó új eredményeink közelebb vihetnek ennek a kulcsfontosságú biológiai folyamatnak a pontosabb megismeréséhez. Kimutattuk, hogy az autofág folyamatnak alapvető szerepe van a sejtek programozott eltávolításában a *C. elegans* egyedfejlődése során. Ugyancsak kulcsfontosságú az autofág rendszer szerepe a stresszhatásokra károsodott sejtek szervezetről történő eltávolításában. Erre vonatkozó eredményeink közelebb vihetnek olyan humán patológiai folyamatok megértéséhez is, amelyek masszív sejtpusztulással jellemezhetők. Ilyen betegségek a neurodegeneratív elváltozások (pl. az Alzheimer, Parkinson és Huntington kórok), az izomsorvadás (*sarcopenia*) különböző formái, valamint a rák. Az autofág rendszer indukált sejthalálban betöltött szerepének tisztázásával sikerült rávilágítanunk a rákgyógyításban központi szerepet játszó dUTPáz enzim új effektor mechanizmusára. A fehérje hiányában alapvetően autofág sejtpusztulás indukálódik. Elért eredmények jelentősen előmozdíthatják elő számos humán betegség kezelési stratégiáját.

7.8. Az autofág gének szerepe az élethossz szabályozásában

Az öregedési folyamat szabályozásának megértése egy alapvető, izgalmas biológiai probléma (Toth és mtsi., 2008). Az élettartamot számos tényező befolyásolja, amelyek közé exogén és endogén eredetű faktorok egyaránt tartoznak. Az endogén faktorok közül a kalorikus restrikció (csökkentett tápanyagfelvétel) hatását közvetítő fehérjéket és a TOR kinázt emelném ki. Mindkét rendszerről tudott, hogy befolyásolják az öregedési folyamatot és szabályozzák az autofág aktivitást. Ezek alapján ésszerű volt feltételeznünk, hogy az autofág gének is szerepet játszanak az öregedési folyamat szabályozásában. Az erre vonatkozó első publikációt Meléndez és mtsi., publikálták 2003-ban (Meléndez és mtsi., 2003). *bec-1*, *lgg-1* és *atg-18* deficiens nematoda törzsek élethosszát vizsgáltuk meg, és mindhárom esetben megrövidült élettartamot detektáltunk a vad típussal összehasonlítva. A három autofág gén

expressziós analízisével kiderítettük, hogy dominánsan olyan szövetekben aktívak, amelyeknek az öregedési folyamatban betöltött szerepe ismert volt.

Autofág gének inaktiválása által előidézett élethossz rövidülés azonban nem szolgáltatott bizonyítékot az autofág rendszer öregedési folyamatot szabályozó szerepére. Noha a (*short-lived*) mutáns fenotípus alapján elképzelhető, hogy az autofág gének normális működése csökkenti az öregedési folyamat rátáját, a legtöbb korai pusztulást okozó mutáció az öregedési folyamattól függetlenül, valamilyen betegséget okozva fejt ki ezt a hatását. Szemléletesen, ha valakit elüt egy autó, nem azért hal meg, mert gyorsan megöregedett. Ennek az anomáliának a feloldására autofág géneket inaktiváltunk hosszú életidejű *let-363/TOR(-)* mutáns és kalorikusan restriktált *eat-2(-)* mutáns állatokban. Minden esetben a hosszú élettartam szuppresszióját detektáltuk, vagyis a kettős mutáns (deficiens) állatok élettartama az autofág egyszeres mutáns (deficiens) állatok élettartamával volt összevethető. Más szavakkal, az autofág gének működése esszenciális a TOR és EAT-2 deficiens állatok hosszú élettartamának megnyilvánulásához. A genetika nyelvén ez azt jelenti, hogy az autofág gének egy útvonalban (*downstream*) hatnak a TOR kinázra és a kalorikus restriktációt közvetítő génekkel. E két *longevity* útvonal tehát az autofág génkaszkádon konvergálódik az élethossz szabályozásában.

Ezek az eredményeink azt sugallják, hogy az autofág gének közvetíthetik az öregedési folyamatot szabályozó különböző genetikai útvonalak (pl. mitokondriális légzési lánc, TGF-beta, inzulin/IGF-1, TOR és Ras útvonalak, p53, *sirtuin* fehérjék, hősokk faktorok) élettartam befolyásoló hatásait. Az autofágia tehát az öregedési folyamat központi szabályozó mechanizmusa. A károsodott fehérjék és sejtstruktúrák citoplazmából történő eltávolításával felelős a sejt anyagainak megújításáért, a citoplazma re-juvenálásáért.

X. ÖSSZEFOGLALÁS

A fajok generációkon keresztüli sikeres fennmaradása megköveteli a genetikai információ stabil fenntartását és a nukleinsavakat felépítő anyagok bioszintézisének szigorú kontrollját. A DNS replikáció pontosságának fenntartására számos szabályozó és megelőző mechanizmus alakult ki az evolúció során. Ezek többsége a hibák kijavítását végzi, és nem a hibák kialakulását akadályozza meg. Létezik egy enzim, a dUTPáz (deoxyuridin trifoszfát nukleotidohidroláz), amely a DNS hibák megelőzésére specializálódott.

A dUTPáz katalizálja a dUTP szubsztrát hasítását dUMP-re és pirofoszfátra, ezáltal egyensúlyt tart fent a dTTP és dUTP előanyaga között. Így megakadályozza az dUTP beépülését a DNS-be. Az enzim esszenciális minden élőlény számára, mert az uracilok beépülése – a különböző javító mechanizmusokon keversztül – duplaszálú DNS störéshez, majd sejthalálhoz (apoptózis) vezethet. Az enzim a DNS metabolizmusban betöltött fontos szerepe miatt számos rákellenes gyógyszer célpontjává vált.

Dolgozatomban a *Caenorhabditis elegans* genetikai modell élőlény dUTPáz enzimét kódoló génjének (*dut-1*) funkcionális jellemzésével foglalkoztam. Az enzim RNS interferencia segítségével végzett inaktiválása pleiotróp fenotípust eredményez. Ennek egyik legmarkánsabb aspektusa az F2 generáció teljes penetranciájú embrionális életképtelensége. A *dut-1* expressziója embriókban csak néhány sejtben megfigyelhető. A fehérje két prediktált izoformája (sejtmagi és mitokondriális) közül csak a rövidebb mutatható ki ebben az organizmusban. dUTPáz megvonás hatására a férgek élettartama két nappal megnövekszik. A fejlődésben megrekedt *dUTPáz(RNSi)* embriók súlyos morfogenetikai rendellenességeket mutatnak. Ezekben az embriókban ectopikus sejtpusztulást lehet kimutatni. PhD munkám gerincét a *dUTPáz(RNSi)* embriókban megfigyelhető sejthalál jellemzése jelentette. Kimutattuk, hogy az irodalmi az irodalmi adatokkal ellentétesen az apoptózis mellett a pusztuló sejtek jelentős része mutat autofág hiperaktivitást: ezekben a sejtekben makroautofág struktúrák (autofagoszómákat és autophagolizoszómákat) tömegesen detektálhatók. Az elektronmikroszkópos megfigyelésekkel összhangban autofágia specifikus repporter konstrukciók masszívan expresszálódnak *dUTPáz(RNSi)* embriókban. Két autofágia specifikus gén szabályozó régiójában konzervált ATF-2 kötőhely található, amelyek *in vitro* és *in vivo* is funkcionálisnak bizonyulnak. Az ATF-2 az apoptotikus génkaszkád *upstream* szabályozó faktora; a két sejthalál út vonal (apoptózis és autofágia) regulációját tehát az ATF-2 összekapcsolja. Eredményeink elvezethetnek fiziológiai és patológiai folyamatok során végbemenő sejtpusztulások molekuláris mechanizmusának pontosabb megértéséhez.

X. SUMMARY

The long-term persistence of species requires the stable maintenance of their genetic material and the strict control of the synthesis of nucleic acid precursors. Several regulatory, checkpoint and repair mechanisms have been evolved in order to maintain the accuracy of DNA replication. Most of them function to repair DNA alterations (i.e., restore the original DNA content), rather than to repress the incidence of mutations. However, there is an enzyme called dUTPase (deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase), which has been specified primarily to prevent the DNA from undergoing structural alterations.

dUTPase catalysis the cleavage of dUTP substrate into dUMP and pyrophosphate, thereby maintaining a balance between cellular dUTP and dTTP pools. This way the enzyme inhibits the incorporation of uracil into DNA. dUTP is an essential factor for each living system because the incorporation of uracil into DNA – through the action of different DNA repair mechanisms – can lead to DNA double-strand breaks, which eventually triggers the affected cells to undergo apoptotic cell death. Due to the importance of dUTPase in DNA metabolism, this enzyme is becoming an important drug target candidate in cancer therapy.

During my PhD work, I have dealt with the genetic characterization of the *dut-1* gene that encodes the enzyme dUTPase in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Inactivation of *dut-1* by RNA interference causes a highly pleiotropic phenotype, an important aspect of which is the fully penetrant embryonic lethality of the F2 generation of the treated animals. During embryonic development, *dut-1* expression is obvious in only a few somatic cells. From the two dUTPase isoforms (a nuclear and a mitochondrial) predicted, only the shorter one can be detected in this organism.

The arrested *dut-1(RNAi)* embryos exhibit severe defects in morphogenesis and tissue patterning. In these specimens ectopic cell death is detectable readily. Our major question was to characterize the nature of cell death observed in embryos defective for dUTPase. We show intense autophagic activity (i.e., the presence of macroautophagic structures) in these embryos. Accordingly, different autophagy-specific reporters are massively expressed in embryos treated with *dut-1* double-stranded RNA. Moreover, we found conserved ATF-2 bindings sites (ATF-2 is a bZip-like transcription factor that serves as an upstream regulator of the core apoptotic cell death pathway) in the promoter region of two key autophagy-related genes, *lgg-1/Atg8* and *bec-1/Atg6*. These potential binding sites proved to be functional both *in vitro* and *in vivo*. Together, these results imply that under certain physiological and pathological conditions, autophagy and apoptosis are co-regulated to ensure the proper morphogenesis and survival of the developing organism. Identifying apoptosis and autophagy

as compensatory cellular pathways in *C. elegans* may help to understand how dysregulated PCD in humans can lead to diverse pathologies, including cancer, neurodegeneration and diabetes.

7.FELHASZNÁLT IRODALOM

Ahmed S, Alpi A, Hengartner MO, Gartner A. *C. elegans* RAD-5/CLK-2 defines a new DNA damage checkpoint protein. *Curr. Biol.* **11**, 1934–1944 (2001).

Alla G. RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. *Febs Letters* **579**, 5932–5939 (2005).

Berry DL, Baehrecke EH. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell* **131**, 1137–1148 (2007).

Bloss T, Witze E, Rothman J. Suppression of CED-3-independent apoptosis by mitochondrial β NAC in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **424**, 1066–1071 (2003).

Blumenthal T, Gleason KS. *Caenorhabditis elegans* operons: form and function. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 112–20 (2003).

Borner C, Monney L. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ.* **6**, 497–507 (1999).

Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71–94 (1974).

Bursch W, Ellinger A. Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann N Y Acad Sci.* **926**, 11–12 (2000).

Caradonna S, Muller-Weeks S. The nature of enzymes involved in uracil-DNA repair: isoform characteristics of proteins responsible for nuclear and mitochondrial genomic integrity. *Curr. Protein Pept. Sci.* **4**, 335–347 (2001).

Carrera AC. TOR signaling in mammals. *J. Cell Sci.* **117**, 4615–4619 (2004).

Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison P, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan K. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* **126**, 121–140 (2006).

Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant α -synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* **305**, 1292–1295 (2004).

Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends in Cell Biol.* **14**, 70–78 (2004).

Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. *Mol. Cell Biochem.* **263**, 55–72 (2004).

Dengg M, Garcia T, Gil S, Ascroft N, Boulton S, Nielsen H. Abrogation of the CLK-2 checkpoint leads to tolerance to base-excision repair intermediates. *EMBO Rep.* **7**, 1046–1051 (2007).

Derry B, Putzke A, Rothman J. *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis meiosis, and stress resistance. *Science* **294**, 591–595 (2001).

Douglas RG. p53 and metabolism: inside the TIGAR. *Cell* **126**, 30–32 (2006).

Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**, 817–829 (1986).

Ellis RE, Jacobson DM, Horvitz HR. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **129**, 79–94 (1991).

Fader CM, Colombo MI. Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation. *Autophagy* **2**, 122–125 (2006).

Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Guinta L, Nardacci R. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* **447**, 1121–1125 (2007).

Fotoohi AK, Albertioni F. Mechanisms of antifolate resistance and methotrexate efficacy in leukemia cells. *Leuk. Lymphoma* **49**, 410–426 (2008).

Gartner A, Milstein S, Shawn A, Hodgkin J, Hengartner M. A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage-induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans*. *Mol. Cell* **5**, 435–439 (2000).

Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito M, Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **15**, 885–889 (2006).

Hengartner MO. Apoptosis: DNA destroyers. *Nature* **28**, 412–427 (2000)

Hengartner MO, Horvitz HR. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* **76**, 665–676 (1994).

Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* **356**, 494–499 (1992).

Hofmann ER, Milstein H, Boulton S, Hoffman J, Stergiou L, Gartner A, Vidal M, Hengartner M. *Caenorhabditis elegans* HUS-1 is a DNA damage checkpoint protein required for genome stability and EGL-1-mediated apoptosis. *Curr. Biol.* **12**, 1908–1918 (2002).

Horvitz HR. Nobel lecture: Worms, life and death. *Biosci. Rep.* **23**, 239–303 (2003).

Horvitz HR, Sternberg PW. Multiple intercellular signalling systems control the development of *Caenorhabditis elegans* vulva. *Nature* **351**, 535–542 (1991).

Hosfield DJ, Daniels DS, Mol CD, Putnam CD, Parikh SS, Tainer JA. DNA damage recognition and repair pathway coordination revealed by structural biochemistry of DNA repair enzymes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **68**, 315–347 (2001).

Jin YJ, Blue EK, Dixon S, Shao Z, Gallagher PJ. A Death-associated Protein Kinase (DAPK)-interacting Protein, DIP-1, Is an E3 Ubiquitin Ligase That Promotes Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis and Regulates the Cellular Levels of DAPK. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 46980–46986 (2002).

Junghans D, Chauvet S, Buhler E, Dudley K, Sykes T, Henderson CE. The CES-2-related transcription factor E4BP4 is an intrinsic regulator of motoneuron growth and survival. *Development* **131**, 4425–4434 (2004).

Kegel KB, Kim M, Sapp E, McIntire C, Castano J, Aronin N, DiFiglia M. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J. Neurosci.* **20**, 7268–7278 (2000).

Kent G, Minick OT, Volini FI, Orfei E. Autophagic vacuoles in human red cells. *Am. J. Pathol.* **48**, 831–857 (1966).

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257 (1972)

Khalfan WW, Klionsky. Molecular machinery required for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) pathway in *S. cerevisiae*. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 468–475 (2002).

Klionsky D, Emr S. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**, 1717–1721 (2000).

Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV. An unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell.* **5**, 539–545 (2003).

Klionsky DJ, Ohsumi Y. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 1–32 (1999).

Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.* **118**, 7–18 (2003).

Klionsky DJ. Good riddance to bad rubbish. *Nature* **441**, 819–820 (2006).

Koehler SE, Ladner RD. Small interfering RNA-mediated suppression of dUTPase sensitizes cancer cell lines to thymidylate synthase inhibition. *Mol. Pharm.* **66**, 620–626 (2004).

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abram J, Baehreckes EH, Alnemri ES, Blagosklonnys MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malomi W, Nunez G, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* **16**, 3–11 (2009)

Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Na. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 1004–1010 (2008).

Kumar S, Cakouros D. Transcriptional control of the core cell-death machinery. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 193–199 (2004).

Ladner RD, Lynch FJ, Groshen S, Xiong, YP, Sherrod A, Caradonna SJ, Stoelmacher J, Lenz HJ. dUTP nucleotidohydrolase isoform expression in normal and neoplastic tissues: association with survival and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Cancer Res.* **60**, 3493–3503 (2000).

Ladner RD. The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. *Curr. Prot. Pept. Sci.* **2**, 361–370 (2001).

Lee CY, Baehrecke EH. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development* **128**, 1443–1455 (2001).

Lee MP. Genome-wide analysis of epigenetics in cancer. *Ann. N Y Acad. Sci.* **983**, 101–109 (2003).

Legakis JE, Yen WL, Klionsky DJ. A cycling protein complex required for selective autophagy. *Autophagy* **3**, 422–432 (2007).

Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* **115**, 2679–2688 (2005).

Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27–42 (2008).

Liang XH, Kleeman L, Jiang H, Gordon G, Goldman J, Berry G, Herman B, Levine B. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel *Bcl-2*-interacting protein. *J. Virol.* **72**, 8586–8596 (1998).

Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by *beclin-1*. *Nature* **9**, 672–676 (1999).

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 330–338 (2003).

Lu X, Lane DP. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell* **75**, 765–778 (1993).

Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris M, Li C, Lindsten T, Thompson C. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **120**, 237–248 (2005).

Lum JJ, DeBerardinis RJ, Hatzivassiliou G, Thompson C. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 439–448 (2005).

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 741–752 (2007).

McGeehan JE, Depledge NW, McGeoch DJ. Evolution of the dUTPase gene of mammalian and avian herpesviruses. *Curr. Protein Pept. Sci.* **4**, 325–333 (2001).

Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2445–2462 (2004).

Meléndez A, Levine B. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* **301**, 1387–1391 (2003).

Metzstein MM, Hengartner MO, Tsung N, Ellis RE, Horvitz HR. Transcriptional regulator of programmed cell death encoded by *Caenorhabditis elegans* gene *ces-2*. *Nature* **382**, 545–547 (1996).

Mills KR, Reginato M, Debnath J, Quenan B, Brugge J. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **101**, 3438–3443 (2004).

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**, 1069–1075 (2008).

Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat. Cell Biol.* **12**, 823–831 (2010).

Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori H, Mizushima N, Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat. Med.* **13**, 619–624 (2007).

Ohsumi Y. Autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. **39**, 632–639 (1994).

Opipari AW, Jr Tan L, Choi M, Huang J, Wahl H, Liu R. Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* **64**, 696–703 (2004).

Otto GP, Wu MY, Kazgan N, Anderson OR, Kessin RH. Dictyostelium macroautophagy mutants vary in the severity of their developmental defects. *J. Biol. Chem.* **279**, 15621–15629 (2004).

Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N. *Bcl-2* antiapoptotic proteins inhibit *Beclin 1*-dependent autophagy. *Cell* **122**, 927–939 (2005).

Petiot A, Denis EO, Bloomart EFC, Meijers AJ, Codogono P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 992–998 (2000).

Plasterk RHA. RNA Silencing: The Genome's Immune System. *Science* **296**, 1263–1265 (2002).

Priet S, Gros N, Navarro JM, Boretto J, Canard B, Quérat G, Sire J. HIV-1-Associated uracil DNA glycosylase activity controls dUTP misincorporation in viral DNA and is essential to the HIV-1 life cycle. *Mol. Cell* **17**, 479–490 (2005).

Pua HH, He YW. Maintaining T lymphocyte homeostasis: another duty of autophagy. *Autophagy* **3**, 266–272 (2007).

Pugacheva E, Ivanov A, Kravchenko J, Kopnin B, Levine A, Chumakov P. Novel gain function activity of p53 mutants: activation of the dUTPase gene expression leading to resistance to 5-fluorouracil. *Oncogene* **21**, 4595–4600 (2002).

Rubinstein D, DiFiglia M, Heintz N, Nixon R, Quin YH, Ravikumar B, Stefanis L, Tolkovsky A. Autophagy and its possible roles in nervous system diseases damage and repair. *Autophagy* **1**, 11–22 (2005).

Saeki K, You A, Okuma E, Yazaki Y, Susin AN, Kroemer G, Takaku F. *Bcl-2* down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Differ.* **7**, 1263–1269 (2000).

Saltiel AR, Kahn R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799–807 (2001).

Schultz DR, Harrington WJ Jr. Apoptosis programmed cell death at a molecular level. *Semin. Arthritis Rheum.* **32**, 345–369 (2003).

Schumacher B, Schertel C, Wittenburg N. *C. elegans ced-13* can promote apoptosis and is induced in response to DNA damage. *Cell Death Differ.* **12**, 153–161 (2005).

Schumacher B, Hanayawa M, Lee MH, Nayak S, Volkmann K, Hofmann R, Hengartner M, Schedl T, Gartner A. Translational repression of *C. elegans p53* by GLD-1 regulates DNA damage-induced apoptosis. *Cell* **120**, 357–368 (2005).

Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev. Cell.* **7**, 167–178 (2004).

Shimizu S, Kanaseki T, Mizusima N, Mizuta T. Role of *Bcl-2* family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1221–1228 (2004).

Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**, 990–995 (2004).

Sigmond T, Barna J, Toth ML, Takacs-Vellai K, Pasti G, Kovacs A, Vellai T. Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Enzymol.* **451**, 521–540 (2008).

Sigmond T, Barna J, Toth ML, Takacs-Vellai K, Pasti G, Kovacs A, Vellai T. Qualitative and quantitative characterization of autophagy in *Caenorhabditis elegans* by electron microscopy. *Methods Enzymol.* **451**, 467–491 (2008).

Studebaker AW, Lafuse WP, Kloesel R, Williams MV. Modulation of human dUTPase using small interfering RNA. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **327**, 306–310 (2005).

Sulston JE, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **56**, 110–156 (1977).

Sulston JE, Schierenberg E. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **100**, 64–119 (1983).

Suzuki K, Noda T, Ohsumi Y. Interrelationships among *Atg* proteins during autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**, 1057–1065 (2004).

Szabo E, Hargitai B, Regos A, Tihanyi B, Barna J, Borsos E, Takacs-Vellai K, Vellai T. *TRA-1/GLI* controls the expression of the Hox gene *lin-39* during *C. elegans* vulva development. *Dev. Biol.* **330**, 339–348 (2009).

Takacs-Vellai K, Vellai T, Puoti A, Passannante M, Wicky C, Streit A, Kovacs A, Müller F. Inactivation of the autophagy gene *bec-1* triggers apoptotic cell death in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **15**, 1513–1517 (2005).

Tasdemir E, Galluzi L, Vicencio J, Kepp O, Kroemer G. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat. Cell Biol.* **10**, 676–687 (2008).

Thomas A, Cathrine K, Ira M, Grace T, Shiv G, Robert M. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**, 1833–1837 (2002).

Thumm M, Egner R, Koch B, Schlumpberger M, Straub M, Veenhuis M, Wolf DH. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **349**, 275–280 (1994).

Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854–860 (1998).

Toth ML, Sigmond T, Borsos E, Barna J, Erdelyi P, Takacs-Vellai K, Orosz L, Kovacs A, Csikos Gy, Sass M, Vellai T. Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* **4**, 1–9 (2008).

Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **333**, 169–174 (1993).

Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Z, Kovacs A, Orosz L, Müller F. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* **426**, 620–630 (2003).

Vellai T, Takacs-Vellai K, Sass M, Klionsky DJ. The regulation of aging: does autophagy underlie longevity? *Trends Cell Biol.* **19**, 487–497 (2009).

Vertessy BG, Tóth J. Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Accounts of Chemical Research* **42**, 97–103 (2009).

Wang X, Jia H, Chamberlin HM. The bZip proteins CES-2 and ATF-2 alter the timing of transcription for a cell-specific target gene in *C. elegans*. *Dev. Biol.* **289**, 456–465 (2006).

Xue D, Shaham S, Horvitz HR. *The Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease. *Genes Dev.* **10**, 1073–1083 (1996).

Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol. Cell. Neurosci.* **14**, 180–198 (1999).

Yip KW, Reed JC. *Bcl-2* family proteins and cancer. *Oncogene* **27**, 6398–6406 (2008).

Yu L, Alva A, Helen S, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke E, Leonardo M. Regulation of an *ATG7-beclin-1* program of autophagic cell death by *caspase-8*. *Science* **304**, 1500–1510 (2004).

Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. *Beclin-1*, an autophagy gene essential for early embryonic development is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **9**, 15077–15082 (2003).

Yuan J, Shaham H, Ledoux S, Elis HM, Horvitz R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* **4**, 641–652 (1993).

Zhang Y, Yan L, Zhou Z, Yang P, Tian E, Zhao Y, Li Z, Song B, Zhang H. *SEPA-1* mediates the specific recognition and degradation of p granule components by autophagy in *C. elegans*. *Cell* **136**, 308–321 (2009).

A dolgozat témájához kapcsolódó saját publikációk

1. Tóth ML, Sigmond T, **Borsos É**, Barna J, Erdélyi P, Takács-Vellai K, Orosz L, Kovács AL, Csikós GY, Sass M, Vellai T. Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* **21**, 330–338 (2008).
(IF: 5,479)
2. Szabó E, Hargitai B, Regős Á, Tihanyi B, Barna J, **Borsos É**, Takács-Vellai K, Vellai T. TRA-1/GLI controls the expression of the *Hox* gene *lin-39* during *C. elegans* vulval development. *Developmental Biology* **330**, 339–348 (2009).
(IF: 4,379)
3. Erdélyi P*, **Borsos É***, Takács-Vellai K, Kovács T, Kovács AL, Sigmond T, Hargitai B, Pásztor L, Sengupta T, Dengg M, Pécsi I, Tóth J, Nilsen H, Vértessy BG, Vellai T. Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Cell Science* In Press (2011).
*Megosztott első szerző
(IF: 6,144)
4. **Borsos É**, Erdélyi P, Vellai T. Autophagy and apoptosis are redundantly required for *C. elegans* embryogenesis. *Autophagy* In Press (2011).
(IF: 6,829)

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Vellai Tibornak szakmai segítségét, türelmét és a lehetőséget, hogy a csoportjában dolgozhattam.

Külön köszönöm a segítséget Dr. Kovács L. Attilának az elektronmikroszkópos módszerekért. Hálával tartozom Dr. Vértessy Beátának és az Enzimológiai Intézet dUTPáz csoport minden tagjának, amiért megismertettek a dUTPáz enzim kísérletes világával.

Nagyon köszönöm Dr. Takács Krisztinának, hogy megtanított sokféle molekuláris biológiai módszerre.

Külön köszönet jár a Dr. Vellai Tibor által vezetett csoport minden tagjának, különösen Erdélyi Péternek, Dr. Hargitai Balázsnak és Barna Jánosnak.

Köszönöm segítségüket a két asszisztensnőnek, Simon Rezsőnének és Pénzes Imrénének.

Végül, de nem utolsósorban, köszönöm szeretteimnek, szüleimnek és barátomnak, Laki Slobodannak, hogy mindig mellettem álltak és mindenben támogattak. Nélkülük nem tudtam volna befejezni PhD munkámat.

